

薬剤誘発性心電図異常に対するコモンマーモセットを用いたヒト予測性に関する研究

| | |
|---------|---|
| 著者 | 渡辺 健太 |
| 著者別表示 | Watanabe Kenta |
| 雑誌名 | 博士論文本文Full |
| 学位授与番号 | 13301甲第4985号 |
| 学位名 | 博士（創薬科学） |
| 学位授与年月日 | 2019-09-26 |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/00059278 |

doi: <https://doi.org/10.2131/jts.44.441>



博 士 論 文

薬剤誘発性心電図異常に対するコモンマーモセ ットを用いたヒト予測性に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬理学教室

学籍番号 1529012010

氏名 渡辺 健太

主任指導教員名 金田 勝幸

目次

| | |
|---|----|
| 第1章 序論 | 4 |
| 第2章 研究方法 | 8 |
| 第1節 動物 | 8 |
| 第2節 コモンマーモセットへの血圧及び心電図測定用テレメトリー送信機埋め込み手術 | 8 |
| 第3節 覚醒コモンマーモセットにおける心電図テレメトリー測定 | 9 |
| 第4節 血漿中被験物質濃度測定 | 12 |
| 第5節 血清中タンパク結合率測定および血漿中非タンパク結合型被験物質濃度算出 | 13 |
| 第6節 濃度測定方法 | 14 |
| 第7節 統計処理方法 | 15 |
| 第3章 マルチ心筋イオンチャネル阻害薬の覚醒コモンマーモセットの心電図に対する作用 | 17 |
| 第1節 緒言 | 17 |
| 第2節 覚醒コモンマーモセットの心電図パラメータの日内変動および個体差に関する検討 | 20 |
| 第3節 覚醒コモンマーモセットの心電図パラメータに対するマルチ心筋イオンチャネル阻害薬の作用 | 22 |
| 第1項 sotalol の作用 (Figure 4) | 23 |
| 第2項 astemizole の作用 (Figure 5) | 24 |
| 第3項 flecainide の作用 (Figure 6) | 25 |
| 第4項 quinidine の作用 (Figure 7) | 26 |
| 第5項 verapamil の作用 (Figure 8) | 28 |
| 第6項 terfenadine の作用 (Figure 9) | 29 |
| 第4節 各被験物質投与後の血漿中濃度推移および血清タンパク結合率 | 30 |
| 第5節 マルチ心筋イオンチャネル阻害薬による心電図異常に対するコモンマーモセットおよびヒトの感受性比較 | 32 |
| 第6節 心電図パラメータ変化の曝露依存性および統計学的解析結果と媒体投与背景値の関係性の検討 | 34 |
| 第7節 心電図パラメータ変化と心筋イオンチャネル阻害の曝露依存性 | 35 |
| 第8節 考察 | 37 |
| 結論 | 47 |
| 謝辞 | 50 |
| 引用文献 | 52 |

略語一覽

| 略語 | 定義 |
|------------------|---|
| 3R | Replacement, Reduction, Refinement |
| Cav1.2 | Voltage dependent sodium ion channel type 1.5 |
| C _{max} | Maximum plasma concentration |
| ECG | Electrocardiogram |
| FIH | First in human |
| GLP | Good laboratory practice |
| hERG | human ether-a-go-go-related gene |
| IC ₅₀ | 50% inhibitory concentration |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use |
| LC-MS/MS | Liquid chromatography-tandem mass spectrometry |
| LOEL | The lowest observed effect level |
| MC | Methylcellulose |
| Nav1.5 | Voltage dependent sodium ion channel type 1.5 |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| QTc | Corrected QT interval |
| S.D. | Standard deviation |
| SRM | Selective reaction monitoring |
| TdP | Torsades de pointes |
| T _{max} | Time to reach maximum plasma concentration |
| TQT | Thorough QT/QTc |

第1章 序論

本研究では、複数の心筋イオンチャネルに対して阻害活性を示す薬剤（マルチ心筋イオンチャネル阻害薬）の覚醒無拘束下コモンマーモセットの心電図 (Electrocardiogram, ECG) に対する影響を評価し、またコモンマーモセットにおいて心電図に影響する用量における各被験物質の血漿中濃度を臨床において同様の心電図異常が報告されている血漿中濃度と比較することで、定量的にコモンマーモセットとヒトとのマルチ心筋イオンチャネル阻害薬に対する作用の感受性を比較した。それにより、覚醒無拘束下コモンマーモセットを用いた心電図評価の創薬研究初期における有用性を検討した。

医薬品開発において、薬剤誘発性不整脈は重篤な毒性の一つであり、特に致死性の多形性心室性頻脈であるトルサード・ド・ポアンツ (torsades de pointes、TdP)[1]は複数の医薬品の市場撤退の原因となった[2, 3]。ヒトにおける TdP 発現には心拍数で補正された QT (QTc)の延長が深く関与していることが報告されており[4, 5, 6]、すなわち TdP イベント発現前に顕著な QTc 延長が認められる (Figure 1)。そのため、医薬品開発では ICH ガイドライン S7[7, 8]および E14[9]において非臨床および臨床試験での QTc 延長作用評価が求められている。

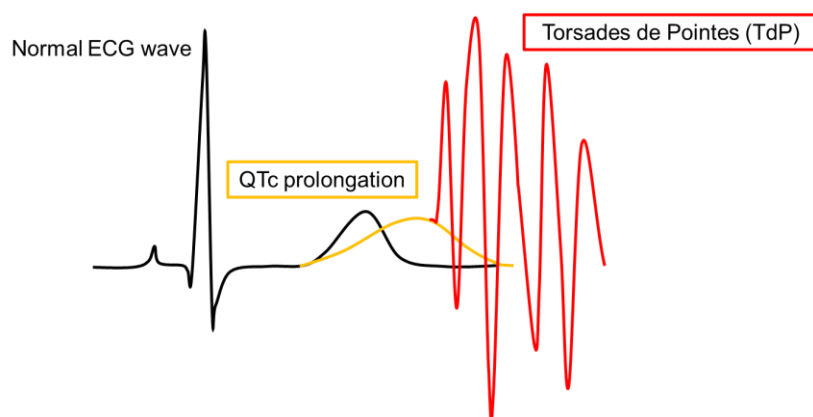


Figure 1 Typical ECG wave as normal (black), QTc prolonged (orange) and TdP

心電図の形成には心筋細胞や電気伝導系の各種イオンチャネルが関与しており[10]、特に薬剤誘発性 QTc 延長に大きく影響するのが human ether-a-go-go-related gene (hERG)チャネルの阻害である。事実、ヒトにおける TdP 発現を原因として市場から撤退を余儀なくされたほとんどの薬剤、例えば astemizole、terfenadine、cisapride などは全て強い hERG 阻害作用を有している[4]。また、1.5 型電位依存性ナトリウムチャネル (Nav1.5)や 1.2 型電位依存性カルシウムチャネル (Cav1.2)は心筋細胞に豊富に発現しており、これらのイオンチャネルの阻害も様々な心電図異常を生じる。Nav1.5 阻害は QRS 幅や PR 間隔の延長、Cav1.2 阻害は PR 間隔の延長や QTc 短縮と、それぞれ密接な関連が報告されている[11]。

医薬品候補化合物の催不整脈性評価においては hERG チャネル阻害作用の評価が重要視されており、ICH ガイドライン S7B で化合物の hERG チャネル電流に対する作用を評価することが求められてきた。さらに、近年は hERG チャネルに加え、Nav1.5 や Cav1.2 に対する阻害作用も含めた統合的な催不整脈リスク評価の必要性が提唱されている。Kramer らは各心筋イオンチャネル電流に対する阻害活性データを用いた統合的な評価法を提案し[12]、また、それらを含む複数の心筋イオンチャネルに対する阻害活性データを使用してヒト心電図に対する作用を予測する *in silico* 評価系の開発も進んでいる[13, 14, 15]。これらの心電図評価法は今後その有用性が検討され、ガイドライン化の是非が議論されることが予想される。

In vitro 評価やその結果を活用した *in silico* 評価は、創薬研究の初期段階において催不整脈ポテンシャルを持つ化合物をスクリーンアウトするための有用な手段であると考えられるが、しかしなお覚醒動物を用いた *in vivo* 心電図評価

は医薬品候補化合物の総合的な非臨床心電図評価として重要である。中でも、テレメトリー送信機を埋め込んだビーグルイヌやカニクイサルを用いて実施されるテレメトリー試験は、覚醒無拘束下動物の心電図を 24 時間以上連続で測定可能であり、また代謝物などを含めたその評価化合物のオーバーオールのカニクイサルが評価可能であることから、最も重要な試験として位置づけられている。従って、医薬品開発のほとんどの例においてファースト・イン・ヒューマン (FIH)試験前に GLP 適用下で実施される[8]。このテレメトリー試験は、医薬品開発の初期段階における心電図評価法としても当然有用ではあるものの、ビーグルイヌやカニクイサルを用いた当該試験実施のためには多量の被験物質が必要であることから、実際には医薬品開発の初期に実施することは困難であることが多い。

コモンマーモセットは「新世界サル」の一種である[16]。近年、創薬研究への応用が検討されており[17]、その小さな体躯のため、少量の被験物質で試験可能な非齧歯動物となる可能性がある（コモンマーモセットの体重は 250-400g 程度と、ビーグルイヌの約 1/20、カニクイサルの約 1/10 である）。心電図評価への応用についても検討が進められており、心電図評価での有用性が確認できれば、これまで困難であった創薬初期での非齧歯動物を用いた *in vivo* 心電図評価が現実的なものとなる。現在までに、テレメトリー送信機の埋め込みにより、ビーグルイヌやカニクイサルと同様に覚醒無拘束下コモンマーモセットでも心電図の連続測定が可能であること[18]、hERG チャネル阻害作用が強く、ヒトにおける QTc 延長作用が知られる sotalol や astemizole の QTc 延長作用が覚醒コモンマーモセットで検出可能であること[19]、臨床 thorough QT/QTc (TQT)試験の陽性対象としても用いられる moxifloxacin の QTc 延長作用の血中曝露依存性が覚醒無拘束下コモンマーモセットとヒトで同等であることが報告されてきた[20]。

従って、hERG チャンネル阻害による QTc 延長作用について、コモンマーモセットを用いることでヒトでの作用を予測可能であることが示唆されている。しかしながら、実際の創薬研究で評価する医薬品候補化合物の多くは複数の心筋イオンチャンネルに対して作用を持つ可能性があるのに対し、コモンマーモセットにおいてマルチ心筋イオンチャンネル阻害による心電図変化が評価可能か否かは検討されておらず、すなわち実際の創薬におけるコモンマーモセットを用いた心電図評価の有用性については十分に検討されていない。そこで本研究では、複数のマルチ心筋イオンチャンネル阻害薬の覚醒コモンマーモセットの心電図パラメータに及ぼす影響を評価し、また心電図異常が認められた際の血漿中被験物質濃度をヒトにおける報告と比較することでその反応性を評価した。その評価結果から、医薬品開発におけるコモンマーモセットを用いた心電図評価の有用性を検討した。

第2章 研究方法

全ての動物実験は大日本住友製薬株式会社付け組織である動物実験倫理委員会の監査下において動物実験指針及び動物飼育管理手順書に従い、3Rの精神を尊重して実施した。

第1節 動物

雄性コモンマーモセット（日本クレア株式会社）を用いた。6頭（3-7歳齢、体重：255-369 g）をテレメトリー測定用に用い、5頭（3-7歳齢、体重：296-373 g）をTK採血用に用いた。全てのコモンマーモセットは個別に、標準的な飼育環境下（温度：25-29℃、相対湿度：30-70%、照明時間：7:00-19:00、換気回数：11-20回/時間）で飼育し、固型飼料（CMS-1M、日本クレア株式会社）を25 g/日を与え、また自由飲水とした。実験終了後、全ての動物は施設の通常飼育下に戻した。

第2節 コモンマーモセットへの血圧及び心電図測定用テレメトリー送信機埋め込み手術

テレメトリー動物作製手術は Horii らの変法に従った[18]。雄性コモンマーモセット（日本クレア株式会社）に塩酸ケタミン（10-20 mg/kg、ケタミン注 5%「フジタ」、フジタ製薬株式会社）およびキシラジン（1-2 mg/kg、セラクター 2%注射液、バイエル薬品株式会社）を筋肉内投与することで導入麻酔し、その後イソフルラン（2%以下）と空気の混合気体を吸入麻酔することで麻酔を維持した。麻酔下においてコモンマーモセットの腹腔内にテレメトリー送信機（Data Sciences International、型式 HD-S11）を固定した。血圧測定用カニューレを腹大動脈にカニューレーションし、また心電図測定用電極を第 II 誘導心電図が測定

可能なよう、陽極電極を左下胸部筋層に、陰極電極を右鎖骨下筋層に固定した。鎮痛剤としてメロキシカム (1mg/kg、ベーリンガーインゲルハイム)を、また抗生物質としてペニシリン (3 万単位あるいは 1.5 万単位、動物用プロカインペニシリン G ゾル、共立製薬株式会社)を手術前日から手術 5 日後まで筋肉内投与し、手術後は少なくとも 4 週間の回復期間を置いた後、のちに記載する被験物質投与およびテレメトリー測定に使用した。

第3節 覚醒コモンマーモセットにおける心電図テレメトリー測定

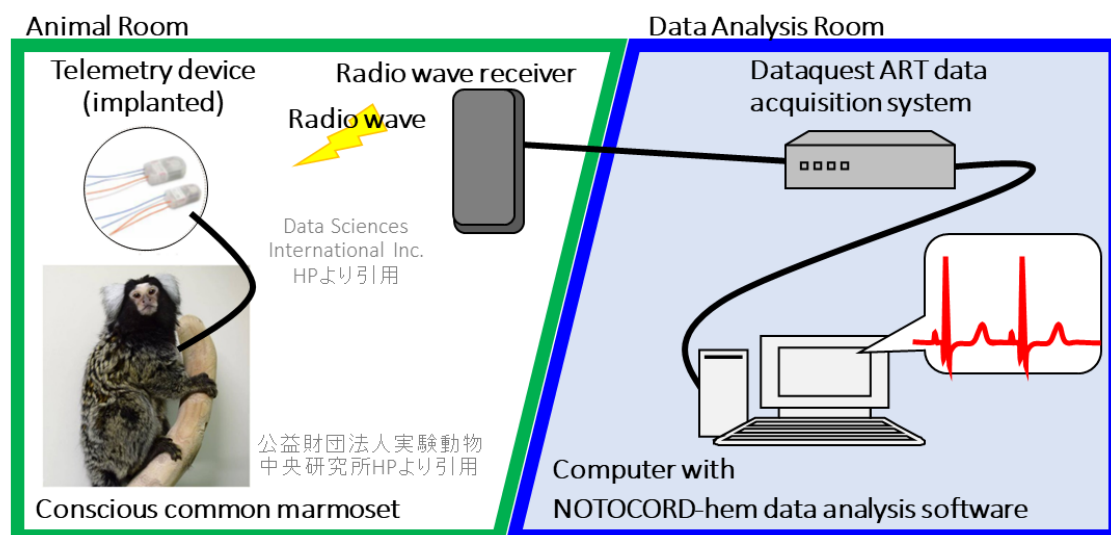


Figure 2 Illustration of the telemetry measuring system of electrocardiogram (ECG) in conscious telemetered common marmoset.

In advance, a telemetry device for ECG measurement was implanted in common marmosets, and it was confirmed that the ECG could be measured without an excessive noise from the telemetered common marmosets. The ECG was measured through the radio wave receiver and recorded in a computer.

覚醒無拘束下マーモセットにおけるテレメトリー心電図測定法の概略図を Figure 2 に示す。テレメトリー送信機埋め込み手術を施し、4 週間以上の回復期間経過したコモンマーモセットについて、テレメトリー測定装置 (Data

Sciences International、型式 Dataquest ART data acquisition system)を用いて心電図 (1000Hz)を覚醒無拘束下にて連続測定した。送信機より得られる電磁波データはマーモセット飼育ケージに取り付けた受信ボードより取り込み、PCへ収録した。動物は個別飼育とし、測定期間中は自由給餌 (25 g/日)・給水とした。正常な心電図が確認されたコモンマーモセットに、1日1回、3日以上水を経口投与することで、投与操作に対する順化を行った。媒体 (0.5%メチルセルロース水溶液、0.5%MC)あるいは 0.5%MC に被験物質を溶解あるいは懸濁させた投与液を、5 mL/kg の投与容量で強制経口投与した。投与用量は投与前日に測定した最新の体重に基づき算出した。各被験物質の評価においては同一の個体 (n=3)を用い、1 週間の投与間隔において低用量から単回漸増投与した。一般状態、血圧、心拍数および心電図パラメータがベースに戻っていることを確認してから投与量を増量した。テレメトリー心電図測定は被験物質投与の少なくとも 2 時間前から投与後少なくとも 25 時間後まで実施した。取得した心電図データは NOTOCORD-hem data analysis software (Notocord Systems SAS)を用いて、各心電図評価時点において 15 拍分の心電図波形について心電図パラメータ値を決定し、それらの平均値として RR 間隔、PR 間隔、QRS 幅および QT 間隔を決定した。典型的なコモンマーモセット心電図を Figure 3 に示す。

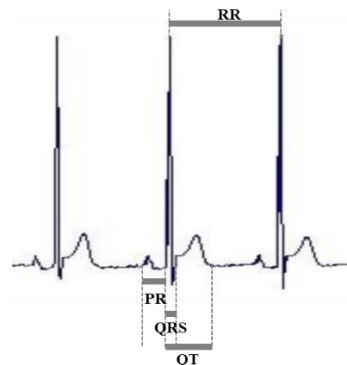


Figure 3 Typical ECG wave forms
PQRS and T_{end} were manually determined.

QTc は Holzgrefe らの変法に従って、下記の式を用いて 1 波形ごとに算出した[21]。

$$\log (QTc) = \log (QT) - \beta (\log (RR) - \log (RR_{ref}))$$

RR_{ref} は Honda らの報告にあるように、コモンマーマーモセットの安静時の RR 値として代表的な 400msec (心拍数として 150bpm)とした[22]。β値を算出するため、テレメトリー測定に用いる全ての動物において、事前に被験物質無処置下で 24 時間以上の心電図を測定し、自動解析された QT 間隔及び PR 間隔について 15 分ごとに平均値を算出した。動物ごとに約 100 個の QT 間隔及び PR 間隔のデータを用いてその回帰直線を描き、その傾きをβ値とした。テレメトリー測定に使用した 6 頭におけるβ値は以下の通りであった。β値： 0.454、0.458、0.523、0.562、0.566、0.634。

本研究においては評価項目としなかったが、動物の状態を確認する目的で血圧及び連続ビデオ観察による一般症状をモニタリングした。

用いた被験物質、投与量、心電図評価時点を Table1 に示す。

Table 1 Summary of used test article, the dose level, and each ECG measurement time point

| Test article | Dose level (mg/kg) | ECG analysis time points (hr post-dose) |
|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Sotalol hydrochloride | 0, 5, 15 (Sotalol として) | 1, 2, 4, 8, 24 |
| Astemizole | 0, 3, 10, 30 | 1, 2, 4, 6, 24 |
| Flecainide acetate salt | 0, 5, 15, 45 (Flecainide として) | 1, 2, 4, 6, 24 |
| Quinidine sulfate salt dihydrate | 0, 5, 25, 120 (Quinidine として) | 1, 2, 4, 6, 24 |
| Verapamil hydrochloride | 0, 15, 50, 150 (Verapamil として) | 1, 2, 4, 6, 24 |
| Terfenadine | 0, 30, 100, 300 | 1, 2, 4, 6, 24 |

第 4 節 血漿中被験物質濃度測定

各被験物質経口投与後の血漿中濃度測定は、各被験物質の心電図評価に用いた動物と異なる 5 頭の雄性コモンマーモセットを用いて実施した。テレメトリー送信機埋め込み手術を実施していないコモンマーモセットに、0.5%MC に被験物質を溶解あるいは懸濁させた投与液を 5 mL/kg の投与容量で強制経口投与した。各被験物質の血漿中濃度評価では同一の個体 (n=3)を用いて低用量から単回漸増投与した。被験物質投与後、Table2 に示す時点において、ヘパリンナトリウムで処理した注射筒及び 25 あるいは 26 ゲージの注射針を用いて、左大腿静脈から血液を約 0.3 mL 採取した。採取した血液を 1.5 mL チューブに移し、採血後 30 分以内に遠心分離(約 1600×g、10 分、4℃)して血漿を得た。血漿は濃度測定まで-80℃で冷凍保存した。用いた被験物質、投与量、および血漿中被験物質濃度測定時点を Table2 に示す。

Table 2 Summary of the dose level and time points for plasma exposure level measurement of each test article

| Test article | Dose level (mg/kg) | Plasma exposure measurement time points (hr post-dose) |
|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| Sotalol hydrochloride | 0, 5, 15 (Sotalol として) | 1, 2, 4, 8 |
| Astemizole | 0, 3, 10, 30 | 1, 2, 4, 6 |
| Flecainide acetate salt | 0, 5, 15, 45 (Flecainide として) | 1, 2, 4 |
| Quinidine sulfate salt dihydrate | 0, 5, 25, 120 (Quinidine として) | 1, 2, 4, 6 |
| Verapamil hydrochloride | 0, 15, 50, 150 (Verapamil として) | 1, 2, 4, 6 |
| Terfenadine | 0, 30, 100, 300 | 1, 2, 4, 6 |

血漿中の sotalol、astemizole、desmethylastemizole、flecainide、quinidine、verapamil および terfenadine 濃度は LC-MS/MS で測定した (第 2 章第 6 節参照)。20-50 µL の血漿を 200 µL の内標準液 (1 µM の phenytoin を含む

methanol)と良く混合し、-20°C で 30 分間静置した。1800×g で 10 分間遠心分離することで調製液中のタンパク質を除去した。この調製液を蒸留水で 3 倍希釈し、LC-MS/MS で分析した。個体ごとに最高血漿中濃度 (C_{\max})および C_{\max} 到達時間 (T_{\max})を算出し、3 個体の平均値を各投与群における C_{\max} および T_{\max} とした。第 5 節で測定した各被験物質の血清中タンパク結合率を用いて、下記の式より血漿中非結合型被験物質濃度を算出した。

$$\text{unbound } C_{\max} = \text{total } C_{\max} \times (100 - \text{serum protein binding ratio}) / 100$$

第 5 節 血清中タンパク結合率測定および血漿中非タンパク結合型被験物質濃度算出

被験物質のコモンマーモセット血清中タンパク結合率はハイスルーブット平衡透析法 (96 穴 Equilibrium DIALYZER 10KD キット (Harvard Bioscience Inc.))を用いて測定した。被験物質を含有するマーモセット血清 (濃度: 3.3 – 10 μM)を Acceptor chamber に添加し、phosphate-buffered saline (PBS、pH=7.4)を Donor chamber に添加した。その平衡透析膜を 37°C で約 22 時間、ローテーション下でインキュベーションすることで平衡状態を作り、その後 Acceptor chamber 中液の 10 μL を取り PBS 40 μL と混合させ、また Donor chamber 中液の 40 μL を取りマーモセット血清 10 μL と混合させた。これらの調製液に 300 μL の内標準液 (1 μM の phenytoin または 1 μM の sulfaphenazole を含む methanol)を加えた後、1800×g で 10 分間遠心分離することで調製液中のタンパク質を除去した。この調製液を蒸留水で 3 倍希釈し、LC-MS/MS で分析した (第 2 章第 6 節参照)。タンパク結合率は次の式を用いて算出した。

$$\text{Protein binding ratio} = [1 - A_{\text{donor}} / (4 \times A_{\text{acceptor}})] \times 100$$

A_{donor} : Donor chamber 液のピークエリア比 (被験物質ピークエリア / 内標準物質のピークエリア)、 A_{acceptor} : Acceptor chamber 液のピークエリア比 (被験物質ピークエリア / 内標準物質のピークエリア)

第6節 濃度測定方法

Sotalol、astemizole、flecainide、quinidine、verapamil および terfenadine の濃度は MS (API4000、API3200Qtrap あるいは API5500Qtrap mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA) および HPLC system (Shimadzu 10A あるいは Shimadzu 20A series (Shimadzu, Kyoto, Japan)) を用いた LC-MS/MS で測定した。LC の分析条件を Table 3 に示す。以下に記載する条件の selective reaction monitoring (SRM) でイオンをモニターした。(m/z: precursor ion → product ion): sotalol (273.2 → 133.4), astemizole (459.4 → 135.2), desmethylastemizole (445.2 → 204.2), flecainide (415.1 → 301.2), quinidine (325.4 → 79.1), verapamil (455.4 → 165.3), terfenadine (472.4 → 436.2), phenytoin (253.2 → 182.2) and sulfaphenazole (315.0 → 158.0).

Table 3 Liquid chromatography method of the compounds

| Compounds | Experiment | Mobile phase | | Gradient | Flow rate (mL/min) | Column | Column temperature (°C) |
|---------------------|------------|--|----------------------------------|----------|-----------------------|--------|-------------------------------|
| | | A | B | | | | |
| sotalol | TK | 0.1% formic acid in water | 0.1% formic acid in acetonitrile | a | 0.4 | e | 40 |
| | PB | 0.1% formic acid in water | 0.1% formic acid in acetonitrile | a | 0.4 | e | 40 |
| astemizole | TK | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | b | 0.4 | f | 40 |
| | PB | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | c | 0.4 | e | 40 |
| desmethylastemizole | TK | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | b | 0.4 | f | 40 |
| | PB | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | c | 0.4 | e | 40 |
| flecainide | TK | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | d | 0.4 | f | 40 |
| | PB | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | c | 0.4 | e | 40 |
| quinidine | TK | 10 mM ammonium formate in water (pH 3.0) | methanol | d | 0.4 | f | 40 |
| | PB | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | c | 0.4 | e | 40 |
| verapamil | TK | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | b | 0.4 | f | 40 |
| | PB | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | c | 0.4 | e | 40 |
| terfenadine | TK | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | d | 0.4 | f | 40 |
| | PB | 10 mM ammonium acetate in water (pH 4.0) | methanol | c | 0.4 | e | 40 |

a: [min, B%] = [0, 5]-[1, 5]-[3, 90]-[4, 90]-[4.1, 5]-[6, 5]

b: [min, B%] = [0, 20]-[0.3, 20]-[2.5, 90]-[3.7, 90]-[3.71, 20]-[5.5, 20]

c: [min, B%] = [0, 5]-[2.5, 90]-[3.7, 90]-[3.71, 5]-[5, 5]

d: [min, B%] = [0, 10]-[0.3, 10]-[2.5, 90]-[3.7, 90]-[3.71, 10]-[5.5, 10]

e: Kinetex XB-C18 column (5 µm particle size, 2.1×50 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)

f: Unison UK-C18 columns (3 µm particle size, 2.0×20 mm, Imtakt, Kyoto, Japan)

第7節 統計処理方法

Sotalol、astemizole、flecainide、quinidine、verapamil および terfenadine の覚醒無拘束下コモンマーモセットにおける心電図テレメトリー測定について、各測定時点の各心電図パラメータは平均±標準偏差にて算出した。各測定時点における血漿中被験物質濃度および血清中タンパク結合率は平均値にて算出した。各心電図パラメータは、試行ごとに各測定時点において媒体群と被験物質を投

与した各群との間で Dunnett の多重比較検定を行い、有意水準 5%にて陽性と判断した。統計学的有意差検定には SAS9.2 (Stat Preclinica、株式会社タクミインフォメーションテクノロジー)を用いた。

第 3 章 マルチ心筋イオンチャネル阻害薬の覚醒コモンマーモセットの心電図に対する作用

第 1 節 緒言

医薬品開発における心電図評価へのコモンマーモセットの有用性についてこれまでいくつか報告されている。しかしながら、複数の心筋イオンチャネル阻害能を有する化合物の作用を検出可能か否かについては報告がない。実際の創薬研究では複数の心筋イオンチャネル阻害作用を示す可能性がある作用未知の化合物について、ヒトの心電図に及ぼす影響を予測することが必要であるため、この点についての検討は重要である。したがって、本研究では複数の心筋イオンチャネルに対して異なるバランスで阻害作用を示す 6 化合物、sotalol、astemizole、flecainide、quinidine、verapamil および terfenadine の覚醒コモンマーモセットの心電図パラメータに及ぼす影響を評価し、ヒトにおいて報告されている心電図異常が覚醒コモンマーモセットにおいても検出可能であるか検討した。これら 6 化合物は臨床における心電図異常発現の報告があり、また血中動態データも参照可能であることから、本研究で医薬品候補化合物のコモンマーモセット心電図を用いた催不整脈ポテンシャル評価の有用性を検証するための適切なツール化合物と判断した。本研究において血漿中濃度測定対象とした化合物の分子量および hERG、Cav1.2 および Nav1.5 に対する阻害活性を Table 4 に示す。

Table 4 Molecular weight and cardiac ion channel inhibitory potential of sotalol, astemizole, desmethyastemizole, flecainide, quinidine, verapamil and terfenadine.

| Test article | Molecular Weight | IC ₅₀ (μM) | | | Reference |
|--------------------|------------------|-----------------------|--------|--------|-----------|
| | | hERG | Cav1.2 | Nav1.5 | |
| Sotalol | 272.4 | 111.4 | 193.3 | 7013.9 | [12] |
| Astemizole | 458.6 | 0.0009 | 1.1 | 3.0 | [12, 23] |
| Desmethyastemizole | 444.5 | 0.001 | N.D. | N.D. | [23] |
| Flecainide | 414.3 | 1.5 | 27.1 | 6.2 | [12] |
| Quinidine | 324.4 | 0.72 | 6.4 | 14.6 | [12] |
| Verapamil | 454.6 | 0.25 | 0.20 | 32.5 | [12] |
| Terfenadine | 471.7 | 0.0191 | 0.93 | 2.0 | [12, 30] |

IC₅₀s reported by Zhou et al and Ando were determined in the manual patch clamp system, whereas those by Kramer et al were in the automated patch clamp system.

N.D.: Not determined.

第 2 節では医薬品化合物を用いた覚醒無拘束下コモンマーマセット心電図への影響を検証するに先立ち、同心電図パラメータの日内変動および個体間のばらつきを媒体処置群における集積データを活用して検証した。マーマセットの各心電図パラメータの日内変動や個体間のばらつき、評価パラメータの特性を把握し、医薬品化合物の心電図パラメータへの影響を判断するための基礎データとした。第 3 節ではコモンマーマセットでは十分に検討されていない前述のマルチ心筋イオンチャネル阻害薬の各心電図パラメータへの影響を詳細に評価し、第 4 節ではサテライト動物を用いたサテライト動物を用いた各被験物質の血漿中濃度及び血清中タンパク結合率を測定した。第 5 節では心電図パラメータ変化と血中曝露の関係性について、コモンマーマセット、ヒト、その他の動物種と比較することでこれら心電図パラメータ変化に対するコモンマーマセットの感受性を検討し、また覚醒無拘束下コモンマーマセットを用いた被験物質の心電図への影響に関してそのヒト予測性を検討した。第 6 節および第 7 節では各被験物質の血漿非結合型曝露ベースで心電図パラメータ変化や各心筋イオンチャネル阻害活性との相関を確認した。相関を詳細に検証することにより、各心

筋イオンチャネルの各心電図パラメータへの寄与を究明した。最後に第 8 節では本研究成果における詳細な考察を展開し、覚醒無拘束下コモンマーモセットを用いた心電図評価系の有用性を示すとともに、その限界について言及した。

第 2 節 覚醒コモンマーモセットの心電図パラメータの日内変動および個体差に関する検討

Table 5 Aggregated ECG parameters of the vehicle control in absolute value (A) and change from pre-value (B) in common marmosets

| (A) Absolute value | | | | | | | | | (B) Change from pre value | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----|----|----|----|----|----|-------|---------------------------|-----|----|----|----|----|---|----|-------|
| PR(msec) | | | | | | | | | PR(msec) | | | | | | | | |
| Time post-dosing (hr) | | | | | | | | | Time post-dosing (hr) | | | | | | | | |
| Time | Pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 | Total | Time | Pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 | Total |
| N | 18 | 18 | 18 | 18 | 15 | 3 | 18 | 108 | N | 0 | 18 | 18 | 18 | 15 | 3 | 18 | 90 |
| Mean | 50 | 50 | 50 | 50 | 51 | 52 | 51 | 50 | Mean | - | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| S.D. | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 7 | 5 | 5 | S.D. | - | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| Max | 56 | 56 | 57 | 57 | 55 | 58 | 56 | 58 | Max | - | 5 | 3 | 3 | 6 | 2 | 6 | 6 |
| Min | 42 | 43 | 41 | 40 | 40 | 45 | 41 | 40 | Min | - | -3 | -3 | -3 | -3 | 0 | -4 | -4 |

| QRS(msec) | | | | | | | | | QRS(msec) | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|----|----|----|----|----|----|-------|-----------------------|-----|----|----|----|----|----|----|-------|
| Time post-dosing (hr) | | | | | | | | | Time post-dosing (hr) | | | | | | | | |
| Time | Pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 | Total | Time | Pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 | Total |
| N | 18 | 18 | 18 | 18 | 15 | 3 | 18 | 108 | N | 0 | 18 | 18 | 18 | 15 | 3 | 18 | 90 |
| Mean | 27 | 26 | 27 | 26 | 27 | 24 | 27 | 27 | Mean | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S.D. | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | S.D. | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Max | 29 | 29 | 29 | 29 | 30 | 27 | 29 | 30 | Max | - | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| Min | 22 | 22 | 21 | 22 | 21 | 21 | 20 | 20 | Min | - | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 |

| QTc(msec) | | | | | | | | | QTc(msec) | | | | | | | | |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|-------|
| Time post-dosing (hr) | | | | | | | | | Time post-dosing (hr) | | | | | | | | |
| Time | Pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 | Total | Time | Pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 24 | Total |
| N | 18 | 18 | 18 | 18 | 15 | 3 | 18 | 108 | N | - | 18 | 18 | 18 | 15 | 3 | 18 | 90 |
| Mean | 146 | 144 | 145 | 143 | 148 | 143 | 148 | 145 | Mean | - | -2 | -1 | -3 | 1 | 0 | 2 | -1 |
| S.D. | 11 | 11 | 13 | 12 | 13 | 10 | 14 | 12 | S.D. | - | 4 | 5 | 4 | 5 | 7 | 6 | 5 |
| Max | 172 | 163 | 171 | 165 | 180 | 150 | 188 | 188 | Max | - | 4 | 5 | 4 | 9 | 8 | 16 | 16 |
| Min | 123 | 115 | 115 | 117 | 132 | 131 | 133 | 115 | Min | - | -10 | -10 | -10 | -6 | -6 | -9 | -10 |

All the vehicle control data (from 18 common marmosets) were aggregated at each time point.

被験物質を用いた覚醒無拘束下コモンマーモセット心電図への影響を検証するに先立ち、同心電図パラメータの日内変動および個体間のばらつきを媒体投与群におけるコントロールデータを用いて検証した。これらデータは本評価系における基礎データとして有用であるばかりでなく、被験物質を用いた各心電図パラメータへの影響を評価するうえでも重要であると考えた。本研究において、延べ 18 頭のコモンマーモセットから媒体投与時の心電図パラメータデータが収集された。その全てを評価時点毎に、測定された絶対値及び投与前値からの

変化量(Δ 値)としてそれぞれ集計した結果を Table 5 に示す。Table 5 に示されたデータは全て明期に取得された値である。全ての心電図パラメータにおいて、絶対値および Δ 値の両方で、顕著な日内変動は認められなかった。そのため、心電図パラメータごとに全てのデータの平均値、標準偏差、最大値および最小値を算出した。全てのパラメータにおいて Δ 値の方が S.D.および最大値と最小値の差が小さかったことから、 Δ 値は比較的個体差が小さく、ばらつきが小さい代表値であると考えられた。

第 3 節 覚醒コモンマーモセットの心電図パラメータに対するマルチ心筋イオンチャネル阻害薬の作用

臨床における心電図異常発現情報が豊富な 6 つのマルチ心筋イオンチャネル阻害薬の、覚醒無拘束下コモンマーモセット心電図に対する影響を評価した。その評価結果を第 1 項以降に順に示す。各被験物質の各心電図パラメータに対する影響は各心電図パラメータの絶対値および Δ 値に対する統計学的有意差検定により判定した。

第1項 sotalol の作用 (Figure 4)

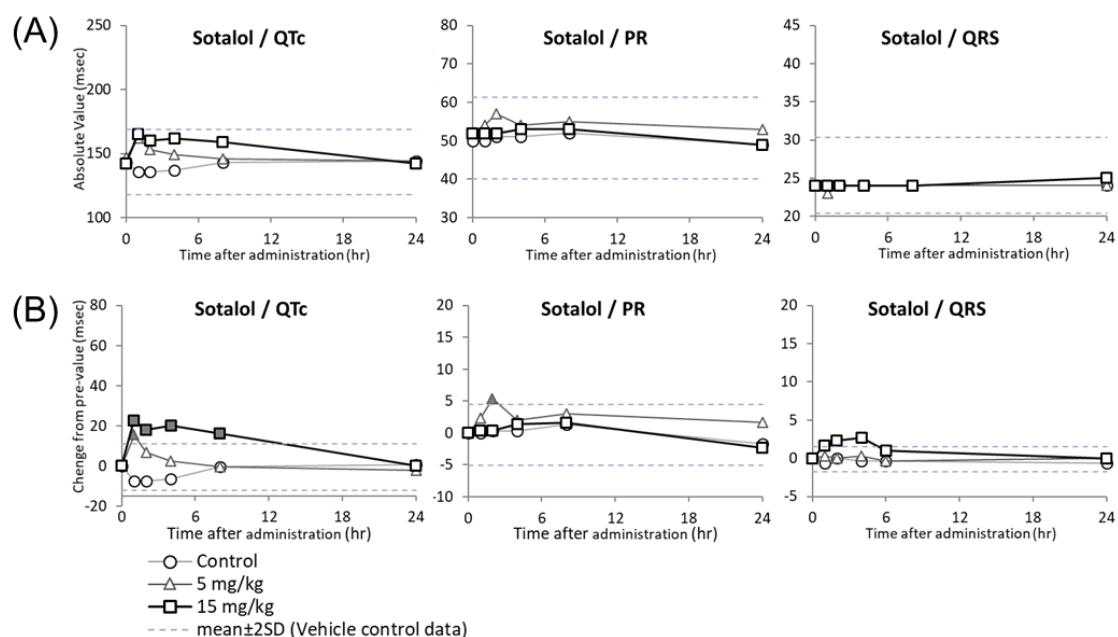


Figure 4 Effects of sotalol on ECG parameters in common marmosets

Time course of QTc, PR interval and QRS duration after oral administration of sotalol are shown in absolute value (A) and in change from pre value (B). Closed symbols represent statistically significant changes from the vehicle control at the time-matched measurement point ($p < 0.05$, compared to data from the vehicle-treated data). Data are presented as mean.

絶対値を用いた評価において、全ての心電図パラメータはいずれの用量でも変化が確認されなかった。

Δ 値を用いた評価において、QTc 延長が 5 mg/kg 以上で認められた。15 mg/kg においては投与後 1 時間から 8 時間まで最大 20 msec の持続的な QTc 延長が確認された。PR 間隔への影響には用量依存性が無く、QRS 幅には影響が認められなかった。

一般状態には異常は確認されなかった。

第2項 astemizole の作用 (Figure 5)

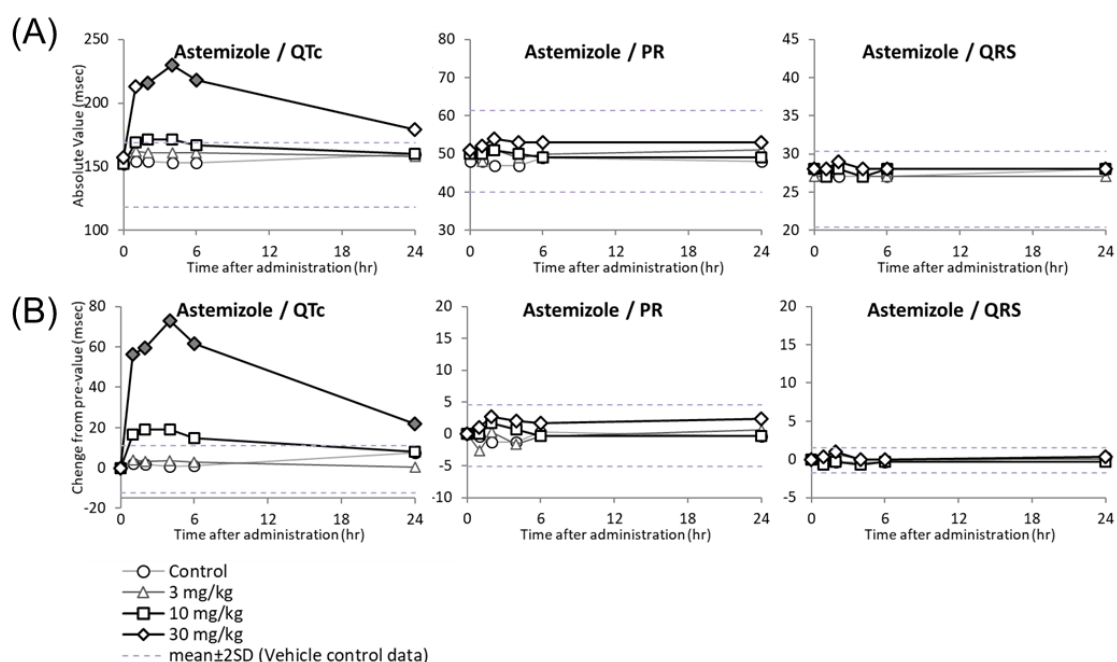


Figure 5 Effects of astemizole on ECG parameters in common marmosets

Time course of QTc, PR interval and QRS duration after oral administration of astemizole are shown in absolute value (A) and in change from pre value (B). Closed symbols represent statistically significant changes from the vehicle control at the time-matched measurement point ($p < 0.05$, compared to data from the vehicle-treated data). Data are presented as mean.

絶対値を用いた評価において、QTc 延長が 30 mg/kg で認められた。PR 間隔および QRS 幅には影響が認められなかった。

Δ 値を用いた評価において、QTc 延長が 30 mg/kg で認められ、作用は投与後 24 時間においても検出された。PR 間隔および QRS 幅には影響が認められなかった。

一般状態には異常は確認されなかった。

第3項 flecainide の作用 (Figure 6)

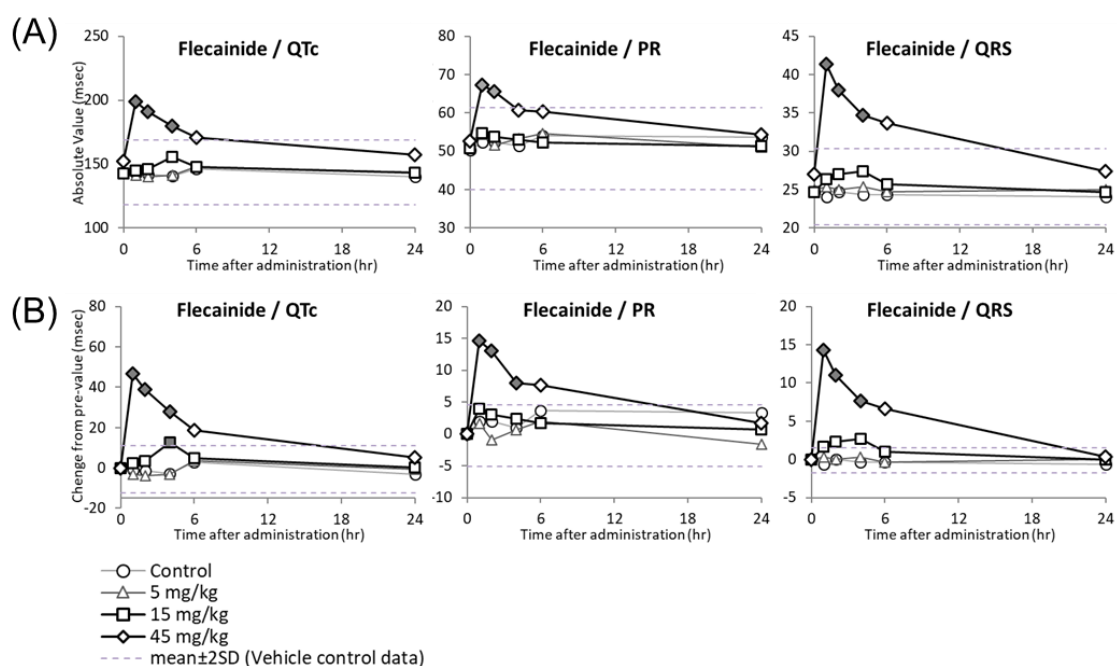


Figure 6 Effects of flecainide on ECG parameters in common marmosets

Time course of QTc, PR interval and QRS duration after oral administration of flecainide are shown in absolute value (A) and in change from pre value (B). Closed symbols represent statistically significant changes from the vehicle control at the time-matched measurement point ($p < 0.05$, compared to data from the vehicle-treated data). Data are presented as mean.

絶対値を用いた評価において、PR 間隔の延長、QRS 幅の延長および QTc 延長が 45 mg/kg で認められた。

Δ 値を用いた評価において、PR 間隔の延長および QRS 幅の延長が 45 mg/kg で認められ、QTc 延長が 15 mg/kg 以上で認められた。

15 mg/kg 以下では一般状態に異常は確認されなかったが、45 mg/kg において全例で嘔吐が認められた。

第 4 項 quinidine の作用 (Figure 7)

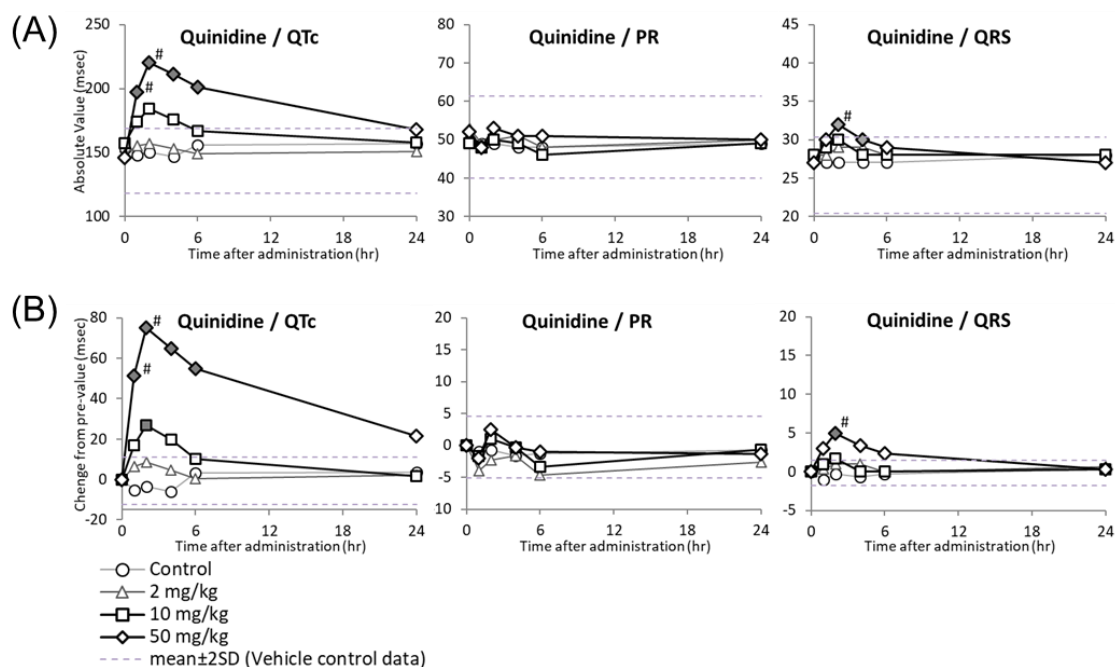


Figure 7 Effects of quinidine on ECG parameters in common marmosets

Time course of QTc, PR interval and QRS duration after oral administration of quinidine are shown in absolute value (A) and in change from pre value (B). Closed symbols represent statistically significant changes from the vehicle control at the time-matched measurement point ($p < 0.05$, compared to data from the vehicle-treated data). #: Judged to be significant. The symbols were filled since the changes noted in 2 common marmosets exceeded the range of any vehicle control data, although, statistical analysis was not conducted. All data are presented as mean.

絶対値を用いた評価において、QRS 幅の延長および QTc 延長が 50 mg/kg で認められた。PR 間隔には影響が認められなかった。

Δ 値を用いた評価において、QRS 幅の延長が 50 mg/kg で、QTc 延長が 10 mg/kg 以上で認められた。PR 間隔には影響が認められなかった。

50 mg/kg 投与後 1 および 2 時間において、1 例で顕著な頻脈が認められた。それにより心電図波形の解析が不可能であったため、当該評価時点においては

評価例数が 2 例となり、統計学的検定を実施できなかった。しかしながら、残り 2 例では、50 mg/kg 投与後 1 あるいは 2 時間において、媒体投与時の変動範囲を大きく超える顕著な QTc 延長が認められ、また 50 mg/kg 投与後 2 時間においては媒体投与時の変動範囲を大きく超える顕著な QRS 幅の延長が認められたため、これについては意義のある変化と考えた。

心電図測定動物においては一般状態に異常は確認されなかったが、血中曝露評価動物では 2 mg/kg 以上で嘔吐が認められた。

第 5 項 verapamil の作用 (Figure 8)

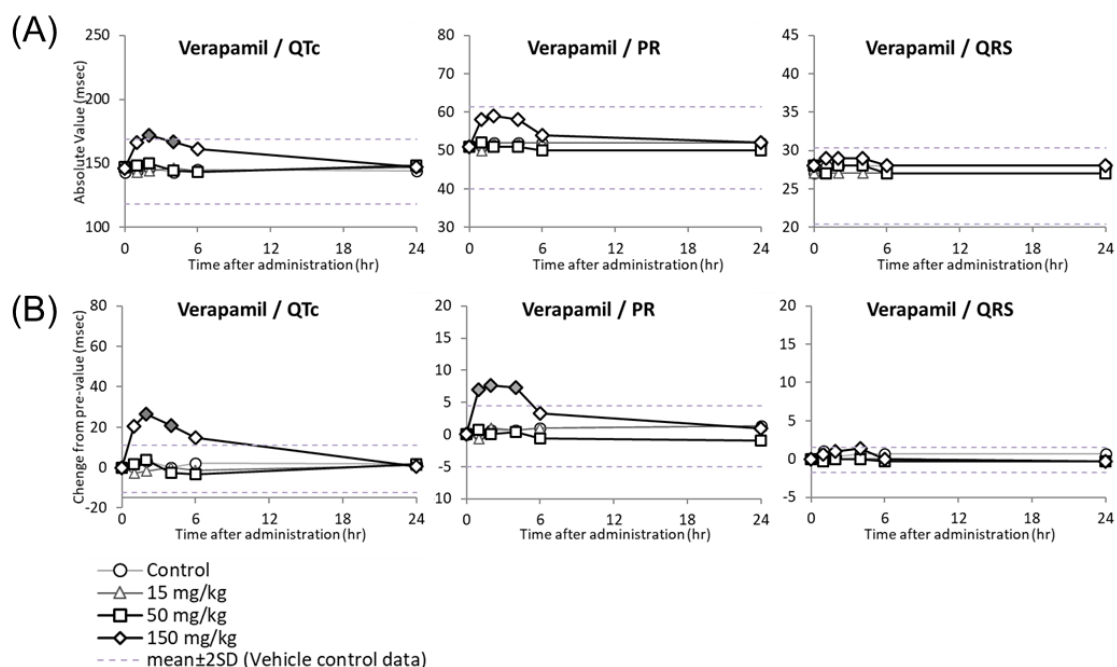


Figure 8 Effects of verapamil on ECG parameters in common marmosets

Time course of QTc, PR interval and QRS duration after oral administration of verapamil are shown in absolute value (A) and in change from pre value (B). Closed symbols represent statistically significant changes from the vehicle control at the time-matched measurement point ($p < 0.05$, compared to data from the vehicle-treated data). Data are presented as mean.

絶対値を用いた評価において、QTc 延長が 150 mg/kg で認められた。PR 間隔および QRS 幅には影響が認められなかった。

Δ 値を用いた評価において、PR 間隔の延長および QTc 延長が 150 mg/kg で認められた。QRS 幅には影響が認められなかった。

一般状態には異常は確認されなかった。

第6項 terfenadine の作用 (Figure 9)

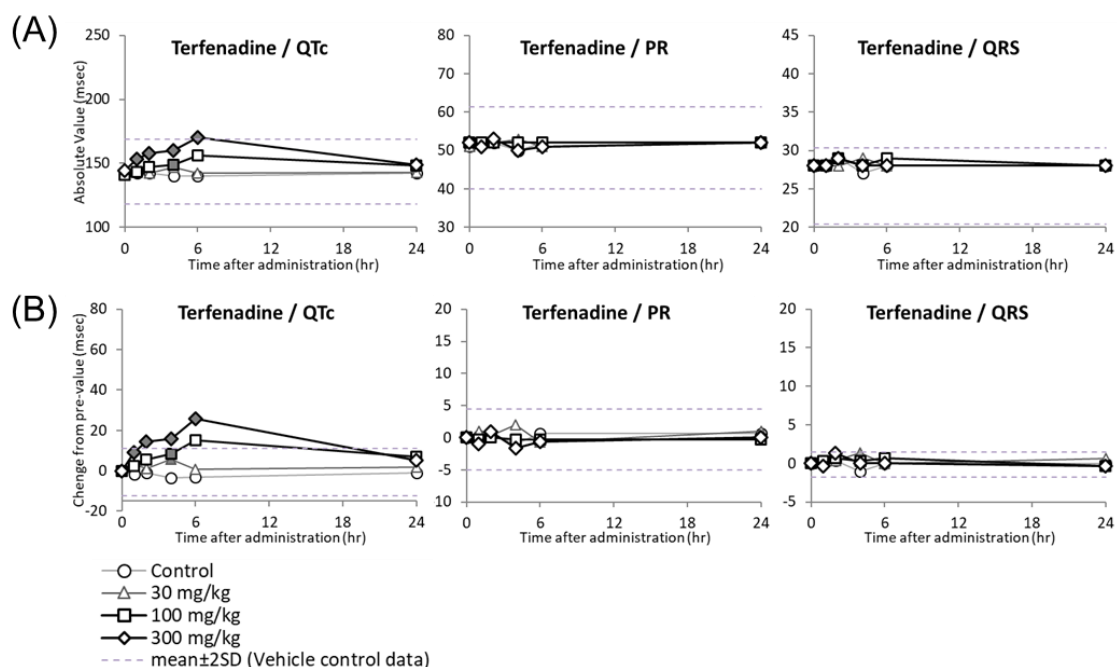


Figure 9 Effects of terfenadine on ECG parameters in common marmosets

Time course of QTc, PR interval and QRS duration after oral administration of terfenadine are shown in absolute value (A) and in change from pre value (B). Closed symbols represent statistically significant changes from the vehicle control at the time-matched measurement point ($p < 0.05$, compared to data from the vehicle-treated data). Data are presented as mean.

絶対値を用いた評価において、QTc 延長が 100 mg/kg 以上で認められた。PR 間隔および QRS 幅には影響が認められなかった。

Δ 値を用いた評価において、QTc 延長が 30 mg/kg 以上で認められた。PR 間隔には影響が認められず、また QRS 幅の変化には用量依存性が無かった。

一般状態には異常は確認されなかった。

第 4 節 各被験物質投与後の血漿中濃度推移および血清タンパク結合率

Table 6 Plasma exposure levels at each time point after oral administration of test articles

| Plasma exposure level (ng/mL) | | | | | | | |
|-------------------------------|------------|------------------|------|------|------|-----------------------------|--------------------------|
| Test article | Dose level | Time post-dosing | | | | C _{max} (ng/mL) | T _{max} (hr) |
| | | 1hr | 2hr | 4hr | 8hr | | |
| Sotalol | 5 mg/kg | 3235 | 4088 | 2779 | 1381 | 4088 | 2.0 |
| | 15 mg/kg | 4435 | 6619 | 6596 | 4029 | 6633 | 4.0 |
| Test article | Dose level | Time post-dosing | | | | C _{max} (ng/mL) | T _{max} (hr) |
| | | 1hr | 2hr | 4hr | 6hr | | |
| Astemizole | 3 mg/kg | 0.28 | 0.39 | N.A. | 0.24 | 0.39 | 3.0 |
| | 10 mg/kg | 5.8 | 2.8 | 1.6 | 1.3 | 5.8 | 1.0 |
| | 30 mg/kg | 31 | 22 | 14 | 11 | 31 | 2.7 |
| Desmethylastemizole | 3 mg/kg | 3.4 | 2.7 | 1.3 | 1.3 | 3.4 | 1.0 |
| | 10 mg/kg | 15 | 11 | 6.7 | 8.8 | 16 | 2.7 |
| | 30 mg/kg | 61 | 49 | 31 | 26 | 61 | 1.0 |
| Flecainide | 5 mg/kg | 84 | 71 | 19 | N.D. | 84 | 1.0 |
| | 15 mg/kg | 1353 | 1337 | 612 | N.D. | 1407 | 1.7 |
| | 45 mg/kg | 4090 | 3897 | 3337 | N.D. | 4140 | 1.3 |
| Quinidine | 5 mg/kg | 476 | 520 | 315 | 178 | 520 | 1.7 |
| | 25 mg/kg | 1553 | 1827 | 1307 | 848 | 1827 | 2.0 |
| | 120 mg/kg | 2700 | 2473 | 2170 | 1717 | 2700 | 1.0 |
| Verapamil | 15 mg/kg | 176 | 71 | 25 | 11 | 176 | 1.0 |
| | 50 mg/kg | 599 | 287 | 106 | 51 | 599 | 1.0 |
| | 150 mg/kg | 1567 | 999 | 568 | 474 | 1567 | 1.0 |
| Terfenadine | 30 mg/kg | 12 | 8.7 | 7.2 | 6.2 | 13 | 2.7 |
| | 100 mg/kg | 34 | 45 | 36 | 29 | 48 | 2.7 |
| | 300 mg/kg | 57 | 97 | 131 | 93 | 135 | 3.3 |

Data are presented as mean of 3 animal's data. N.A.: Not applicable. N.D.: No data.

Table 7 Test articles serum protein binding ratio in common marmosets

| Test article | Plasma protein binding ratio in common marmoset (%) |
|---------------------|--|
| Sotalol | 5.2 |
| Astemizole | 99.2 |
| Desmethylastemizole | 98.1 |
| Flecainide | 55.6 |
| Quinidine | 91.1 |
| Verapamil | 97.1 |
| Terfenadine | 99.6 |

コモンマーモセットに各被験物質を経口投与した後の血漿中曝露のタイムコースを Table 6 に、またコモンマーモセット血清中におけるタンパク結合率を Table 7 に示す。

Desmethylastemizole は astemizole の主要代謝物として知られている。Astemizole と desmethylastemizole は同等の hERG 阻害活性を示し、IC₅₀ はそれぞれ 0.9 nM および 1.0 nM であるため[23]、astemizole 投与個体から採取した血漿においては desmethylastemizole 濃度も測定した。

いずれの被験物質においても投与量に応じた血漿中曝露が確認された。Astemizole 投与群においては未変化体を超える濃度の代謝物 desmethylastemizole が検出された。また、flecainide の低用量 5 mg/kg と中用量 15 mg/kg との間には投与量比を大きく上回る血漿中曝露 (約 15 倍) が認められ、投与量と血漿中濃度との間に正の非線形がみられた。

今回各被験物質で認められた心電図パラメータ変化の発現時間は被験物質の血漿中濃度推移や T_{max} とよく相関していた。

第 5 節 マルチ心筋イオンチャネル阻害薬による心電図異常に対するコモンマーモセットおよびヒトの感受性比較

第 3 節に示した通り、各被験物質はコモンマーモセットにおいて心電図パラメータ変化を起こす。コモンマーモセットの Δ 値を用いた評価において心電図パラメータ変化が認められた投与量での血中非結合型被験物質 C_{\max} を Table 6 および Table 7 の数値を用いて算出し、さらに臨床情報や文献からヒト、ビーグルイヌあるいはカニクイサルにおける心電図パラメータ変化時の血中非結合型被験物質濃度を確認した。その一覧を Table 8 に示す。Verapamil による QTc 延長を除いて、ヒトにおいて報告がある全ての心電図異常はコモンマーモセットにおいても検出された。また Astemizole による QTc 延長を除いたその他の心電図パラメータ変化は、コモンマーモセットとヒトで同程度の血中曝露下において認められた (0.4 - 3.8 倍の乖離)。Astemizole による QTc 延長はコモンマーモセットとヒトでその発現時の曝露が大きく乖離していた (14.5 倍以上)。コモンマーモセットでは verapamil 投与後に QTc 延長が認められたものの、ヒト、ビーグルイヌおよびカニクイサルでは報告がなかった。ビーグルイヌおよびカニクイサルでは、flecainide による QTc 延長の報告がなく、また astemizole による QTc 延長については報告はあるものの血漿中非結合型濃度の情報が無かったため、比較できなかった。Flecainide による QTc 延長はヒトで報告されているものの、ビーグルイヌおよびカニクイサルでは報告が無かった。また、terfenadine による QTc 延長は、コモンマーモセットとヒトは同程度の血中曝露において認められていたものの、ビーグルイヌではそれより 30 倍以上の高曝露下でのみ検出されていた。

Table 8 Plasma unbound levels of test articles at ECG parameters changed condition in common marmosets, beagle dogs, cynomolgus monkeys, and human

| Test article | Changed ECG parameter | Plasma levels showing the ECG changes (ng/mL) | | | Ratio | | Reference |
|--------------|-----------------------|---|-------------|----------------------|-----------|------------|--|
| | | CM | H | D & M | CM / H | CM / D & M | |
| Sotalol | QTc prolongation | 3875 | 1008 - 2996 | (D) 3073 | 1.3 - 3.8 | 1.3 | D: [24] H: [4][25] |
| Astemizole | QTc prolongation | 0.247 | <0.0165 | N.A. | >14.5 | N.C. | D: [26] M: [27] H: [4][28] |
| Flecainide | QTc prolongation | 625 | 660 | N.D. | 1 | N.C. | D: [24] H: [29][30] |
| | PR prolongation | 1838 | 669 | (D) 996 | 2.7 | 1.8 | |
| | QRS widening | 1838 | 669 | (D) 256 | 2.7 | 7.2 | |
| Quinidine | QTc prolongation | 163 | 97-224 | (D) 395 (M) 166 | 0.7 - 1.7 | 0.4 - 1.0 | D: [26][31] M: [27][32] H: [4][30] |
| | QRS widening | 240 | 599 | (D) 908 (M) N.D. | 0.4 | 0.3 | |
| Verapamil | QTc prolongation | 45 | N.A. | N.D. | N.C. | N.C. | D: [24] H: [30] M: [27] |
| | PR prolongation | 45 | 94 | (D) 17.6 (M) N.D. | 0.5 | 2.6 | |
| Terfenadine | QTc prolongation | 0.05 | 0.09 | (D) 6.52 (M) N.A. | 0.6 | 0.008 | D: [33][34] M: [35] H: [4] |

Data for common marmosets are based on the results of this study. Data for beagle dog, cynomolgus monkeys and human are reported in the literature. N.A.: Not available due to a lack of protein binding ratio data. N.D.: Not detected even at the highest dose. N.C.: Not calculated. CM: Common marmoset, H: Human, D: Dog, M: Monkey.

第 6 節 心電図パラメータ変化の曝露依存性および統計学的解析結果と媒体投与背景値の関係性の検討

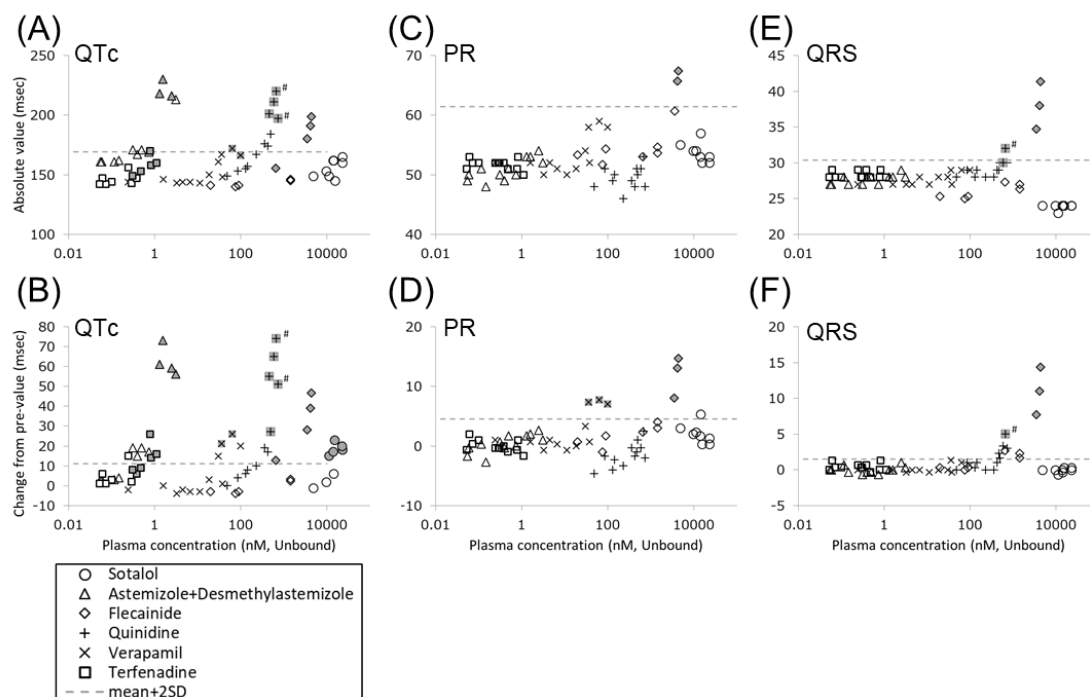


Figure 10 Plasma exposure relationships with multiple cardiac ion channel inhibitor-induced change in ECG parameters in common marmoset.

Plasma exposure relationship with changes in ECG parameters, which were induced by sotalol, astemizole+desmethyastemizole, flecainide, quinidine, verapamil or terfenadine, were evaluated. The relationship with QTc is shown in the absolute value (A) or the change from pre-value (B), with PR interval is shown in the absolute value (C) or the change from pre-value (D), with QRS duration is shown in the absolute value (E) or the change from pre-value (F). The closed symbols represent statistically significant changes from vehicle control ($p < 0.05$, compared with the vehicle-treated data). #: Judged as significant since the changes noted in 2 common marmosets exceeded the range of any vehicle control data, although the statistical analysis was not conducted.

コモンマーモセットにおける心電図パラメータ変化と血中曝露の相関を Figure 10 に示す。Astemizole と desmethyastemizole は同等の hERG 阻害活性を示すため[23]、血漿中非結合型化合物濃度として両化合物の合計値を用いた。いずれのパラメータ変化も各被験物質の血中曝露依存的に生じていることが確認された。

第7節 心電図パラメータ変化と心筋イオンチャネル阻害の曝露依存性

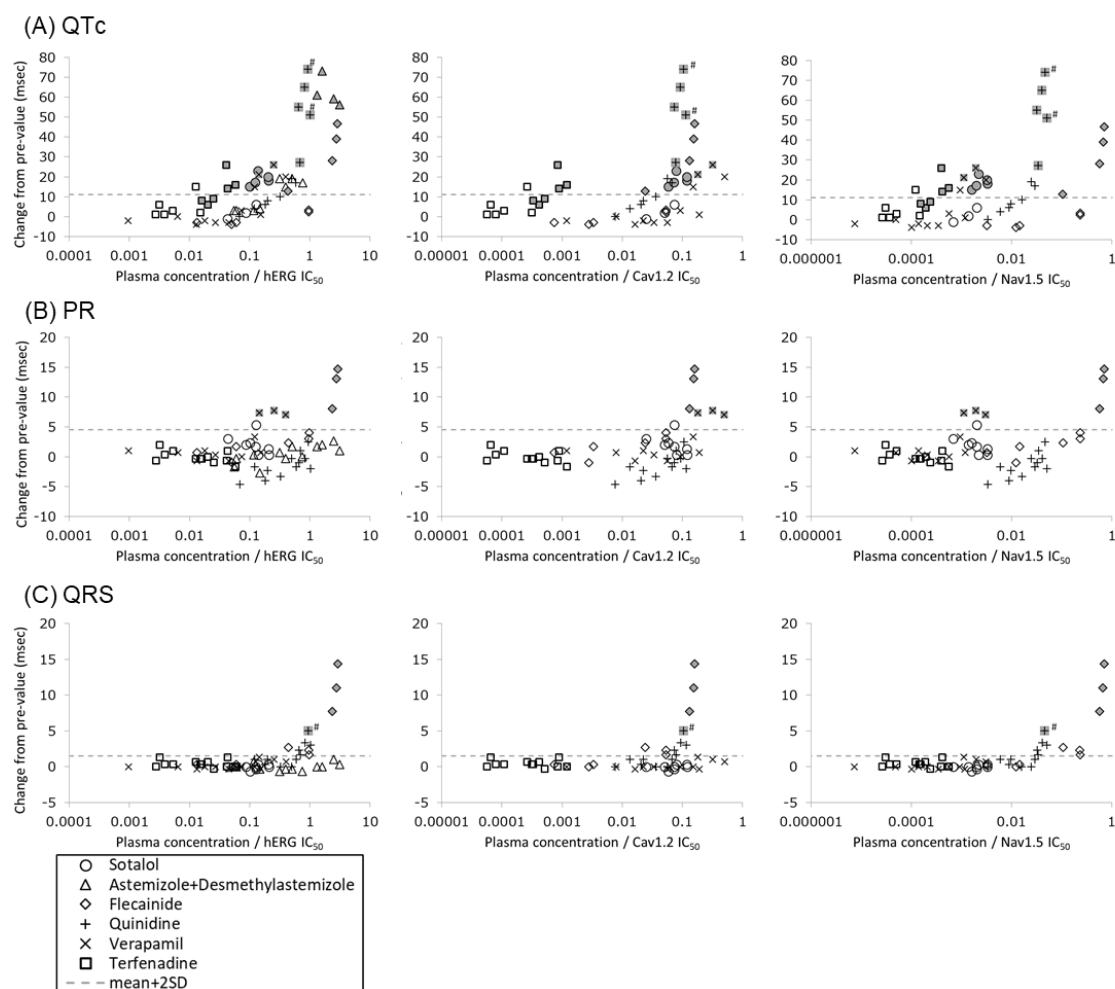


Figure 11 Relationship between ion channel inhibition and change in ECG parameters (QTc (A), PR (B), QRS (C)) in common marmoset.

X axis shows a ratio of unbound plasma concentration / IC_{50} for each cardiac ion channel and Y axis shows change from pre value in QTc, PR interval and QRS duration. Astemizole+desmethyastemizole is not included for the relationship analysis with Cav1.2 and Nav1.5 because IC_{50} for Cav1.2 and Nav1.5 of desmethyastemizole have not been reported. The closed symbols represent significant changes from vehicle control. #: Judged as significant since the changes noted in 2 common marmosets exceeded the range of any vehicle control data, although the statistical analysis was not conducted.

コモンマーモセットにおける心電図パラメータ変化と hERG、Cav1.2 および Nav1.5 IC_{50} に対する各血漿非結合型被験物質濃度比の相関を Figure 11 に示

す。Figure 11 の X 軸は各心筋イオンチャネルの IC_{50} に対する非結合型被験物質濃度の比を表し、すなわち X 軸の数字が大きいほど強く心筋イオンチャネルが阻害されている。QTc は hERG 阻害と良く相関し、特に hERG IC_{50} の 1/10 を上回る曝露域では高頻度に有意な QTc 延長が認められることが明らかとなった。一方、Cav1.2 阻害や Nav1.5 阻害との相関は明確でなく、各チャネルに対する IC_{50} の 1/1000 以下の血漿中曝露域においても有意な変化が認められる例が散見された。PR 間隔は Cav1.2 阻害と良く相関し、特に Cav1.2 IC_{50} の 1/10 程度から高頻度に有意な PR 延長が認められた。一方、PR 間隔は hERG 阻害や Nav1.5 阻害との相関は明確でなかった。QRS 幅は Nav1.5 阻害と良く相関し、Nav1.5 IC_{50} の 1/30 程度の血漿中曝露域から高頻度に媒体投与時の変動範囲を超える大きな QRS 延長が認められることが明らかとなった。一方、hERG 阻害や Cav1.2 阻害との相関は明確でなく、例えば、astemizole 投与後十分に hERG チャネルが阻害された状態でも QRS 延長が認められず、また verapamil 投与後十分に Cav1.2 チャネルが阻害された状態でも QRS 延長は認められなかった。

第8節 考察

まず、延べ18頭のコモンマーモセットに媒体を経口投与した際の心電図パラメータ変化を集計し、明期における心電図パラメータの変動を確認した。その結果、PR 間隔、QRS 幅、QTc の全てにおいて変動は認められず、明期においては日内変動が少ないことが確認された。時間依存的な変動はなかったものの、測定された絶対値においてはいずれの心電図パラメータもばらつきが大きく、特に高値を示す個体と低値を示す個体の差が大きかったことから、ばらつきの大きさは個体差の大きさに起因するものと考えられた。一方、 Δ 値は個体差によるばらつきが小さかったため、より高感度に被験物質の心電図パラメータへの影響を検出可能な代表値であると考えられた。事実、本研究に用いたマルチ心筋イオンチャンネル阻害薬の心電図パラメータへの作用は、 Δ 値を用いた評価の方がより低用量あるいはより多くの評価時点において検出された (Table 9)。本研究においては、実際の創薬研究初期での試験実施を意識し、少数例 (n=3) の動物を用いた漸増投与のデザインを採用しており、この試験系は一般に統計学的検出力が低い試験系である。従って、より統計学的検出力の高い、治験申請用の試験で用いられる試験系 (n=4、ラテン方格) においては、 Δ 値を用いた評価との検出力の差はより小さくなると考えられる。

Table 9 Summary of the change in ECG parameters induced by multiple cardiac channel inhibitors in common marmoset.

| Test article | ECG parameter | LOEL (mg/kg) | | Number of time points at which ECG change was noted | |
|--------------|---------------|--------------|----------|---|----------|
| | | A | Δ | A | Δ |
| Sotalol | QTc | - | 15 | 0 | 5 |
| Astemizole | QTc | 30 | 30 | 3 | 4 |
| Flecainide | QTc | 45 | 15 | 3 | 4 |
| | PR | 45 | 45 | 2 | 3 |
| | QRS | 45 | 45 | 3 | 3 |
| Quinidine | QTc | 50 | 10 | 4 | 5 |
| | QRS | 50 | 50 | 2 | 1 |
| Verapamil | QTc | 150 | 150 | 2 | 2 |
| | PR | - | 150 | 0 | 3 |
| Terfenadine | QTc | 100 | 30 | 5 | 6 |

The lowest observed effect level for ECG parameter change by each test article and the number of time points at which change in ECG parameter was noted are summarized. LOEL: the lowest observed effect level. A: Absolute value. Δ : Change from pre value.

次に、マルチ心筋イオンチャネル阻害薬である sotalol、astemizole、flecainide、quinidine、verapamil および terfenadine の覚醒コモンマーモセットにおける心電図パラメータに対する作用を検討した。また、各被験物質が各心電図パラメータに影響を及ぼした投与量における血中非結合型被験物質濃度をコモンマーモセット、ヒト、ビーグルイヌあるいはカニクイサルと比較することで、その感度を比較した。ヒトにおいては、verapamil を除いた全ての化合物において QTc 延長が報告されている。また flecainide および verapamil において PR 延長が、flecainide および quinidine において QRS 延長がそれぞれ報告されている。本研究においても、これらの心電図パラメータ変化が全て検出されたことから、コモンマーモセットを用いてマルチ心筋イオンチャネル阻害薬の心電図に対する作用を評価可能であることが確認された。

QTc 延長に関して、コモンマーマセットにおける最小作用量 (LOEL)の血漿中非結合型 C_{\max} をヒトにおける報告と比較すると、sotalol、flecainide、quinidine および terfenadine のいずれにおいても 4 倍以内であったことから、これら化合物によるヒト QTc 延長はコモンマーマセットを用いた評価によって十分予測可能と考えられた。

Astemizole による QTc 延長については、コモンマーマセットとヒトにおいて作用量における血中曝露が大きく乖離していた(14.5 倍以上)。この原因として、astemizole から desmethylastemizole への代謝種差による可能性があるが、以下の考察により否定した。Desmethylastemizole の hERG IC_{50} は 1.0 nM であり、これは astemizole の hERG IC_{50} (0.9 nM)と同程度であるため[23]、desmethylastemizole は astemizole 投与後の QTc 延長に寄与していると考えられる。Table 10 に示す通り、コモンマーマセット、ヒト、ビーグルイヌ、カンクイサルの各種において QTc 延長が認められた際にも血漿中に astemizole と同等以上の desmethylastemizole が検出されている。コモンマーマセットの QTc 延長 LOEL (30 mg/kg)において、血漿中 desmethylastemizole 総濃度はいずれの評価時点においても血漿中 astemizole 総濃度の 2 倍程度 (astemizole 総濃度 : 31 ng/mL、desmethylastemizole 総濃度 : 61 ng/mL)であったのに対し、ヒトにおいて QTc 延長が認められた時の血漿中 desmethylastemizole 総濃度は血漿中 astemizole 総濃度の 30 倍以上 (astemizole 総濃度 : 0.5 ng/mL 以下、desmethylastemizole 総濃度 : 7.7 ng/mL)であることから[28]、確かに代謝種差がある可能性がある。しかしながら、ヒトにおける desmethylastemizole のタンパク結合率が不明であるため非結合型濃度での比較はできなかったものの、astemizole および desmethylastemizole の合算の総濃度を比較すると、コモンマーマセット (92 ng/mL)とヒト (8.2 ng/mL 以下)では依然として 10 倍以上の

乖離が認められたことから、やはり astemizole による QTc 延長に関して、コモンマーモセットとヒトとでは種差があると考えられた。ビーグルイヌあるいはカニクイサルにおいても astemizole および desmethylastemizole のタンパク結合率が不明であったため、非結合型濃度での比較はできなかったが、総濃度での比較は可能であり、astemizole 総濃度においてはコモンマーモセット、カニクイサルおよびビーグルイヌにおいて大きな差は認められなかった。desmethylastemizole 濃度は大きく異なったもの、astemizole および desmethylastemizole の合算値においては大きな乖離はなく、また合算値は小さい順にビーグルイヌ、コモンマーモセット、カニクイサルであった。従って、astemizole 投与後の QTc 延長に関して、コモンマーモセットはヒトより感受性が劣る可能性があるものの、一般に非臨床評価に用いられるビーグルイヌおよびカニクイサルと同程度の感受性で評価が可能であることが示唆された。

Table 10 Plasma concentration of astemizole and desmethylastemizole at QTc prolonged dose in human, common marmoset, monkey and dog.

| Species | Unbound plasma concentration | | Total plasma concentration | | | Ref |
|-------------------|------------------------------|------|----------------------------|-----|-------|----------|
| | (ng/mL) | | (ng/mL) | | | |
| | A | D | A | D | A + D | |
| Human | <0.0165 | N.A. | <0.5 | 7.7 | <8.2 | [4] [28] |
| Common marmoset | 0.247 | 1.15 | 31 | 61 | 92 | - |
| Cynomolgus monkey | N.A. | N.A. | 10 | 230 | 240 | [27] |
| Beagle dog | N.A. | N.A. | 13 | 15 | 28 | [26] |

A: astemizole, D: desmethylastemizole, Ref: Reference, N.A.: Not available due to a lack of protein binding ratio data

コモンマーモセットにおいて認められた verapamil 投与後の QTc 延長は、ヒト、カニクイサルおよびビーグルイヌにおいては報告されていない。しかしなが

ら、本研究において、高用量の verapamil 投与後の血漿中非結合型 C_{\max} (45 ng/mL = 99 nM)は hERG IC_{50} (250 nM)[12]付近にまで達していることから (Figure 11)、この血中曝露下で QTc 延長が認められたことに何ら疑問はない。

しかし、verapamil は hERG チャネル阻害能に加え、QTc 短縮に寄与すると考えられている強い Cav1.2 阻害能も有していることから (Table 3)、両チャネルが阻害された結果として、ヒトにおいては QTc や心室筋再分極時間にほとんど影響しないと考えられている[36, 37]。コモンマーモセットで QTc 延長が認められた原因として、体温低下による影響が挙げられる。体温低下と QTc 延長の関連はヒトを含む複数の動物種において報告されており、ヒトにおいては深部体温 33-34°C 程度の軽度な低体温下で顕著な QTc 延長が認められている[38, 39, 40]。本研究においては verapamil 投与後、2°C を上回る体温低下が認められており、またこの体温低下と QTc 延長が良く相関していたことから (Figure 12)、この作用が verapamil 投与後の QTc 延長に寄与した可能性が高いと考えられた。体温低下の感受性には個人差あるいは動物種差が存在し、体脂肪量あるいは体表面積との相関が示唆されている。例えば、ヒトであれば成人よりも新生児などの方が体表面積/体重比 (≡体表面積/体脂肪量比)が大きいことため体温が低下しやすく[41]、また動物実験においては、薬剤性の体温低下に対する感受性はカニクイサルよりラットの方が高い[42]。すなわち、体温低下は体表面積/体重比が大きくなる小型の動物の方が生じやすく、体温低下に起因する QTc 延長も小型の動物ほど生じやすいと考えられる。コモンマーモセットはヒト、ビーグルイヌおよびカニクイサルと比較して、体重が 1/200~1/10 程度と非常に小型であるため、体温低下に関連する QTc 延長作用が生じやすい動物種であると考えられた。ビーグルイヌやカニクイサルにおいては、ヒトと同様に verapamil による QTc 延長は報告されていない[26, 27]ため、本研究において認められた verapamil の

QTc 延長作用はコモンマーモセットのような小型な動物に特徴的な、体温低下作用に起因する二次的な作用であると考えられた。

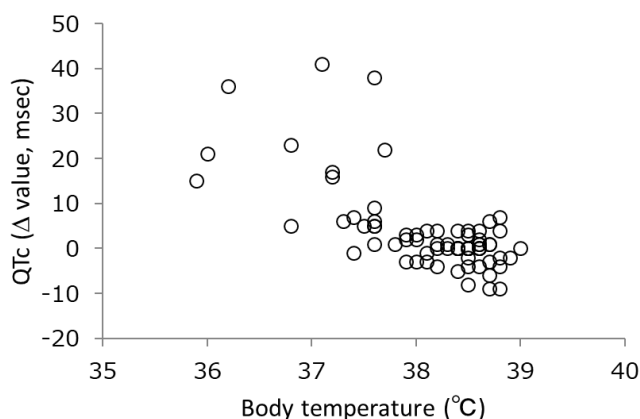


Figure 12 Relationship between QTc change and body temperature after verapamil administration.

X axis shows body temperature and Y axis shows Δ values of QTc. QTc prolongation was well associated with decrease in body temperature.

Terfenadine による QTc 延長に対して、コモンマーモセットとビーグルイヌで大きく感受性が異なることが示唆された。Table 8 に示す通り、ビーグルイヌにおいては非結合型 C_{\max} 6.52 ng/mL で QTc 延長が生じたと考えられたが、これはヒトの QTc 延長時の非結合型血中曝露 (0.19 ng/mL) より 30 倍以上高く、コモンマーモセットにおける曝露値 (0.05 ng/mL) と比較して 100 倍以上高い。なお、Toyoshima らも、ビーグルイヌでは総濃度 C_{\max} 181 ng/mL まで QTc 延長が認められないことを報告しており [26]、原因は不明であるが、複数の報告からビーグルイヌの低感受性が示唆されている。カニクイサルにおいては、terfenadine の単独投与によっては低い経口吸収性のため QTc 延長が認められていない [27] もの、強い CYP3A4 阻害作用を持つケトコナゾールを併用することで総濃度 C_{\max} が 26 ng/mL まで上昇し、QTc 延長が認められている [35]。コモンマーモセットにおいては、Terfenadine 単独投与により、総濃度 C_{\max}

45 ng/mL から QTc 延長が認められていることから、カニクイサルの感受性はコモンマーモセットと同程度であることが示唆された。従って、QTc 延長の感受性と経口吸収性のヒト類似性の観点から、コモンマーモセットはビーグルイヌやカニクイサルより terfenadine による QTc 延長作用の評価に適した動物種であると考えられた。

Flecainide について、コモンマーモセットでは QRS 延長などが認められる用量域において、またヒトと同程度の曝露において QTc 延長が認められたのに対し、ビーグルイヌにおいては QRS 延長などが認められる投与量以上の用量においても QTc に変化が認められていない[24]。この種差の原因は不明であるが、コモンマーモセットではヒトと同程度の曝露において、また hERG IC₅₀ 付近まで曝露が達する条件において QTc 延長が認められていることから、より適切に評価できていると考えられた。

ヒトにおける PR 延長は Cav1.2 阻害能の強い flecainide および verapamil で報告されており、コモンマーモセットにおいても同様に認められた。作用量における血漿中非結合型濃度をコモンマーモセットとヒトにおける報告とで比較すると、その差は 3 倍以内 (0.5 - 2.7 倍) であり、ヒトと同程度の曝露域において PR 延長が検出されたと考えられた。本研究に用いたその他の化合物ではヒトにおける PR 延長の報告がなく、またコモンマーモセットでも QTc 延長などが認められる高い投与量においても PR 間隔に対する変化は認められなかった。ビーグルイヌとの比較においても、PR 延長時の血中曝露に大きな乖離はなかった (1.8 - 2.6 倍の乖離)。従って、ヒトにおける PR 延長作用はコモンマーモセットを用いた心電図評価によって予測可能であり、その感度はビーグルイヌに劣らないことが示唆された。

ヒトにおける QRS 延長は Nav1.5 阻害能の強い flecainide および quinidine で報告されており、コモンマーモセットにおいても同様に認められた。作用量における血漿中非結合型濃度をコモンマーモセットとヒトにおける報告とで比較すると、その差は 3 倍以内 (0.4 - 2.7 倍)であり、同程度の曝露によって QRS 延長が認められたと考えられた。また、本研究に用いたその他の化合物ではヒトでの QRS 延長の報告が無く、またコモンマーモセットにおいても QTc 延長などが認められる高い投与量においても QRS 幅に対する変化は認められなかった。ビーグルイヌとの比較においても、QRS 延長時の血中曝露に大きな乖離はなかった (0.3 - 7.2 倍の乖離)。従って、ヒトにおける QRS 延長作用はコモンマーモセットを用いた評価によって予測可能であり、その感度はビーグルイヌに劣らないことが示唆された。

本研究において認められた心電図パラメータ変化は全て血漿中被験物質曝露に相関して認められた。特に QTc 延長については hERG 阻害と、PR 延長については Cav1.2 阻害と、また QRS 延長については Nav1.5 阻害との高い相関が認められた。Redfern らは hERG 阻害と QTc 延長について定性的に相関があると報告しており、さらに hERG 阻害と TdP 発生の相関についてはより定量的に、hERG IC₅₀ と有効血漿中非結合型濃度との乖離が 30 倍以下の化合物で TdP リスクが高いとしている[4]。また近年の Systems Pharmacology 手法の発展に伴い、hERG 阻害と QTc 延長の定量的な相関についても検討が進んでいる。Sotalol、dofetilide および moxifloxacin を用いた検討では、化合物ごとに差が認められたものの、ビーグルイヌにおいては 1-12%の hERG 電流阻害により 6 msec 以上の QTc 延長が、健常人においては 1-19%以上の hERG 電流阻害により 10 msec 以上の QTc 延長が生じることが報告されている[25]。本研究において、コモンマーモセットでも hERG 阻害と良く相関した QTc 延長が認められ

たことは先の報告と一致する。また、媒体投与時の変動域を超える 11.0 msec 以上の QTc 延長は、いずれの化合物においても血漿中非結合型薬物濃度/hERG IC₅₀ 比が 0.1 程度の血中曝露下から認められた。本研究において、QTc 延長発現時の具体的な hERG 電流阻害値に言及することはできないが、少なくともコモンマーモセットの hERG 阻害に起因する QTc 延長に対する感受性がヒトやビーグルイヌと比較して大きく異なる可能性は低いと考えられた。PR 延長は Cav1.2 阻害と、QRS 延長は Nav1.5 阻害との相関が一般的に言われており、その定量的な相関については、flecainide、quinidine および verapamil を用いて検討されている。健常人では 5-7%の Nav1.5 阻害により 10%の QRS 延長が生じ、12-22%の Cav1.2 への化合物の結合により 10%の PR 延長が生じることが報告されている[30]。本研究において、コモンマーモセットでも PR 延長が Cav1.2 阻害と良く相関し、また QRS 延長が Nav1.5 阻害と良く相関したことは、先の報告と一致する。本研究において、QRS 延長時あるいは PR 延長時の Nav1.5 阻害あるいは Cav1.2 阻害の程度に言及することはできないが、本研究において媒体投与時の変動域を超える変化 (4.5 msec 以上の PR 延長および 1.5 msec 以上の QRS 延長)はそれぞれ Cav1.2 IC₅₀ および Nav1.5 IC₅₀ を 10 倍以上下回る曝露下から認められたことから、これらの相関性についてコモンマーモセットとヒトおよびビーグルイヌにおいて大きく異なる可能性は低いと考えられた。従って、コモンマーモセットにおいて認められた心電図パラメータ変化は、ヒトやその他の動物種と同様のメカニズムで生じたものと考えられた。

本研究において、有意な心電図パラメータ変化のほとんどが媒体投与データの平均+2 S.D.を超えた変化であったことから、統計学的比較検定が行えないような n 数の少ない試験を実施した場合においても、媒体投与時のデータを基にしたクライテリアを用いることで、統計学的比較検定と同程度の検出力を持つ

て被験物質の作用の有無を判定することが可能であることが示唆された。実際の創薬研究初期では、作用未知な化合物の評価にあたり、本研究で用いた少数例の漸増投与の試験を実施することが多いため、このようなクライテリアの意義は高いと考えられた。

結論

本研究では、複数のマルチ心筋イオンチャネル阻害薬のコモンマーモセットの心電図に対する作用を評価し、その結果を用いてヒト心電図に対する作用の予測性について検討した。

本研究において、以下のような結果を得た。

1. コモンマーモセットの心電図パラメータは、明期において時間依存的な変化は認められなかった。測定された絶対値においては大きな個体差が認められたが、投与前値からの変化量については個体差が小さかった。
2. ヒトにおいて報告されている各マルチ心筋イオンチャネル阻害薬の作用、すなわち sotalol、astemizole および terfenadine の QTc 延長作用、flecainide の PR 延長・QRS 延長・QTc 延長作用、quinidine の QRS 延長・QTc 延長、verapamil の PR 延長は、全てコモンマーモセットを用いて検出された。
3. コモンマーモセットにおける上記心電図パラメータ変化は、astemizole の QTc 延長作用を除き、全てヒトと同程度の血漿中曝露において認められた。
4. astemizole の QTc 延長作用は、コモンマーモセット、カニクイサルおよびビーグルイヌにおいては同程度の血漿中曝露において認められた。
5. コモンマーモセットにおいて、verapamil 投与後に体温低下作用に起因すると考えられる二次的な QTc 延長が認められた。これは小型な動物に特徴的な変化であることが示唆されている。
6. 上記の心電図パラメータ変化について、絶対値を用いた評価と比較し、投与前値からの変化量を用いた評価ではより高感度に変化が検出された。

7. コモンマーモセットにおける心電図パラメータ変化は、血漿中非結合型薬物濃度依存的に生じ、またヒトやその他の動物種での報告と同様に、QTc延長については hERG 阻害と、PR 延長については Cav1.2 阻害と、QRS 延長については Nav1.5 阻害と高い相関が認められた。
8. コモンマーモセットにおける有意な心電図パラメータ変化は、ほとんどが媒体投与データを集計した背景値を超える変化であった。

過去の研究結果からヒト心電図に及ぼす影響が既知である複数のマルチ心筋イオンチャネル阻害薬について、覚醒無拘束下コモンマーモセットでは、ヒトと同様のチャネル阻害メカニズムによって同様の心電図変化が認められると考えられたことから、コモンマーモセットを用いることで薬剤および医薬品候補化合物がヒトで生じうる心電図異常を高精度に予測することが可能であると考えられた。

しかしながら、カニクイサルやビーグルイヌと同様に、astemizole による QTc 延長のような種差を克服できない作用は存在することが示唆されたため、特に活性代謝物が生成される可能性のある化合物の評価においては、注意深く評価しなければならないと考えられた。

また、コモンマーモセットはその小さい体躯のため、ヒト、カニクイサルおよびビーグルイヌより体温低下が生じやすいと考えられ、その体温低下は心電図パラメータに影響することから、コモンマーモセットを用いた心電図評価では体温に対する作用を同時に評価することが、ヒトでの心電図作用の予測に必要であると考えられた。

創薬研究における心電図評価の目的は、心筋イオンチャネルに対する作用が未知な化合物のヒト心電図に対する影響を予測することである。いくつかの課題が明らかとなったものの、コモンマーモセットを用いた心電図評価はこの目的を十分に達成すると期待される。コモンマーモセットは通常 *in vivo* 心電図評価に頻用されるビーグルイヌやカニクイサルと比較して非常に小型な動物種であることから、非常に少ない被験物質量でも *in vivo* 心電図評価が可能であり、加えて心電図パラメータ変化の有無は媒体投与時のデータを用いた背景値を用いて判断可能であることが示唆されたことから、コモンマーモセットを用いた心電図評価は創薬の初期段階に実施する小スケールな *in vivo* 心電図評価系として非常に有用であると考えられた。

本研究成果の活用により、より効果的な創薬研究の推進が可能となることが期待された。

謝辞

本研究を発表するにあたり、懇切に御指導いただきました金沢大学大学院、金田勝幸教授、檜井栄一准教授に深く感謝致します。

本研究実施の際に、終始御指導いただいた大日本住友製薬株式会社 坪内義主席研究員に厚く御礼申し上げます。

最後に、本学位取得の機会を与えて頂きました株式会社住化分析センター 船橋斉氏、大日本住友製薬株式会社 原田秀幸リサーチディレクター、坂東清子フェロー、宮脇出前臨床研究ユニット長、山田徹安全性第 2 グループマネージャーに深く御礼申し上げます。

参考論文及び副論文

参考論文

Watanabe, K., Tsubouchi, T., Yamada, T., Hinoi, E. and Miyawaki, I. Common marmosets, a useful animal model to evaluate the effects of multiple cardiac channel inhibitors on electrocardiogram parameters. *Journal of Toxicological Sciences*, 44, 441-457, July 2019

副論文

なし

引用文献

1. Johnston, J., Pal, S. and Nagele, P. (2013): Perioperative torsade de pointes: a systematic review of published case reports. *Anesth Analg.*, 117, 559-64.
2. Li, M., and Ramos, L.G. (2017): Drug-induced QT prolongation and torsades de pointes. *P T.*, 42, 473–477.
3. De Ponti, F., Poluzzi, E. and Montanaro, N. (2001) Organising evidence on QT prolongation and occurrence of Torsades de Pointes with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus. *Eur J Clin Pharmacol.*, 57, 185-209.
4. Redfern, W.S., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P.K., Strang, I., Sullivan, A.T., Wallis, R., Camm, A.J. and Hammond, T.G. (2003): Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res.*, 58, 32-45.
5. Haverkamp, W., Breithardt, G., Camm, A.J., Janse, M.J., Rosen, M.R., Antzelevitch, C., Escande, D., Franz, M., Malik, M., Moss, A. and Shah, R. (2000) The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.*, 21, 1216-1231.
6. Webster, R., Leishman, D. and Walker, D. (2002) Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de

- pointes. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 5, 116-126.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals (2000) the ICH Steering Committee
 8. ICH Harmonised Tripartite Guideline: The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals (2005) the ICH Steering Committee
 9. ICH Harmonised Tripartite Guideline: The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs (2005) the ICH Steering Committee
 10. Lane J.D. and Tinker A. (2017) Have the findings from clinical risk prediction and trials any key messages for safety pharmacology? *Front Physiol*, 8, 890.
 11. Priest, B.T. and McDermott, J.S. (2015) Cardiac ion channels. *Channels*, 9, 352-359.
 12. Kramer, J., Obejero-Paz, C.A., Myatt, G., Kuryshev, Y.A., Bruening-Wright, A., Verducci, J.S. and Brown, A.M. (2013): MICE models: superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. *Sci Rep.*, 3, 2100.
 13. O'Hara, T., Virág, L., Varró, A. and Rudy, Y. (2011): Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput Biol.*, 7, e1002061.
 14. Kubo, T., Ashihara, T., Tsubouchi, T. and Horie, M. (2017): Significance of integrated in silico transmural ventricular wedge preparation models of

- human non-failing and failing hearts for safety evaluation of drug candidates. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 83, 30-41.
15. Li, Z., Ridder, B.J., Han, X., Wu, W.W., Sheng, J., Tran, P.N., Wu, M., Randolph, A., Johnstone, R.H., Mirams, G.R., Kuryshev, Y., Kramer, J., Wu, C., Crumb, W.J. Jr. and Strauss, D.G. (2018): Assessment of an in silico mechanistic model for proarrhythmia risk prediction under the CiPA initiative. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, [ahead of print].
 16. Saito, A. (2015): The marmoset as a model for the study of primate parental behavior. *Neurosci Res.*, 93, 99-109.
 17. Okano, H., Hikishima, K., Iriki, A. and Sasaki, E. (2012) The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. *Semin Fetal Neonatal Med.*, 17, 336–340.
 18. Horii, I., Kito, G., Hamada, T., Jikuzono, T., Kobayashi, K. and Hashimoto, K. (2002): Development of telemetry system in the common marmoset - cardiovascular effects of astemizole and nicardipine. *J Toxicol Sci.*, 27, 123-130.
 19. Tabo, M., Hara, T., Sone, S., Shishido, N., Kuramoto, S., Nakano, K., Onodera, H., Kimura, K. and Kobayashi, K. (2008): Prediction of drug-induced QT interval prolongation in telemetered common marmosets. *J Toxicol Sci.*, 33, 315-325.
 20. Komatsu, R., Honda, M., Holzgrefe, H.H., Kubo, J., Yamada, Y., Isobe, T., Kimura, K., Itoh, T., Tamaoki, N. and Tabo, M. (2010): Sensitivity of common marmosets to detect drug-induced QT interval prolongation:

- Moxifloxacin case study. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 61, 271-276.
21. Holzgrefe, H.H., Cavero, I., Gleason, C.R., Warner, W.A., Buchanan, L.V., Gill, M.W., Burkett, D.E. and Durham, S. K. (2007): Novel probabilistic method for precisely correcting the QT interval for heart rate in telemetered dogs and cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 55, 159–175.
 22. Honda, M., Komatsu, R., Holzgrefe, H.H., Yamada, Y., Isobe, T., Kimura, K., Itoh, T., Tamaoki, N. and Tabo, M. (2010): Application of probabilistic analysis for precisely correcting the QT interval for heart rate in telemetered common marmosets. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 61, 264-270.
 23. Zhou, Z., Vorperian, V.R., Gong, Q., Zhang, S. and January, C.T. (1999): Block of hERG potassium channels by the antihistamine astemizole and its metabolites desmethylastemizole and norastemizole. *J Cardiovasc Electrophysiol.*, 10, 836-843.
 24. Herbert, M.H., Alexandra, B., Michael, H., Rolf, B., Horst, L., Matthias, S. and Erich, W. (2011): Field and action potential recordings in heart slices: correlation with established in vitro and in vivo animal models. *Br J Pharmacol.*, 166, 276-96.
 25. Gotta, V., Yu, Z., Cools, F., van Ammel, K., Gallacher, D.J., Visser, S.A., Sannajust, F., Morissette, P., Danhof, M. and van der Graaf, P.H. (2016) Application of a systems pharmacology model for translational prediction of hERG-mediated QTc prolongation. *Pharmacol Res Perspect.*, 4, e00270. doi: 10.1002/prp2.270.

26. Toyoshima, S., Kanno, A., Kitayama, T., Sekiya, K., Nakai, K., Haruna, M., Mino, T., Miyazaki, H., Yano, K. and Yamamoto, K. (2005): QT PRODACT: In vivo QT assay in the conscious dog for assessing the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals. *J Pharmacol Sci.*, 99, 459-471.
27. Ando, K., Hombo, T., Kanno, A., Ikeda, H., Imaizumi, M., Shimizu, N., Sakamoto, K., Kitani, S., Yamamoto, Y., Hizume, S., Nakai, K., Kitayama, T. and Yamamoto, K. (2005): QT PRODACT: In vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation. *J Pharmacol Sci.*, 99, 487-500.
28. Vorperian, V.R., Zhou, Z., Mohammad, S., Hoon, T.J., Studenik, C. and January, C.T. (1996): Torsade de pointes with an antihistamine metabolite: potassium channel blockade with desmethylnemizole. *J Am Coll Cardiol.*, 28, 1556-1561.
29. Salerno, D.M., Granrud, G., Sharkey, P., Krejci, J., Larson, T., Erlien, D., Berry, D. and Hodges, M. (1986): Pharmacodynamics and side effects of flecainide acetate. *Clin Pharmacol Ther.*, 40, 101-107.
30. Bergenholm, L., Parkinson, J., Mettetal, J., Evans, N. D., Chappell, M. J., and Collins, T. (2017) Predicting QRS and PR interval prolongations in humans using nonclinical data. *Br J Pharmacol.*, 174, 3268–3283.
31. Cros, C., Skinner, M., Moors, J., Laine, P., and Valentin, J.P. (2012): Detecting drug-induced prolongation of the QRS complex: new insights for cardiac safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 265, 200-208.
32. Akabane, T., Tabata, K., Kadono, K., Sakuda, S., Terashita, S. and

- Teramura, T. (2010): A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys. *Drug Metab Dispos.*, 38, 308-16.
33. Van Deuren, B., Van Ammel, K., Somers, Y., Cools, F., Straetemans, R., van der Linde, H.J. and Gallacher, D.J. (2009): The fentanyl/etomidate-anaesthetised beagle (FEAB) dog: a versatile in vivo model in cardiovascular safety research. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 60, 11-23.
34. Webster, R., Allan, G., Anto-Awuakye, K., Harrison, A., Kidd, T., Leishman, D., Phipps, J. and Walker, D. (2001) Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the effects of E4031, cisapride, terfenadine and terodiline on monophasic action potential duration in dog. *Xenobiotica.*, 31, 633–650.
35. Ando, K., Unakami, S., Obo, M., Sasaki, A., Makita, Y., Yamamoto, Y. and Hayashi, K. (2005): QT-prolongation effect of orally administered terfenadine in conscious cynomolgus monkeys –interaction with ketoconazole-. *Adv Anim Cardiol.*, 38, 9-20.
36. Britton, O.J., Abi-Gerges, N., Page, G., Ghetti, A., Miller, P.E. and Rodriguez, B. (2017) Quantitative comparison of effects of dofetilide, sotalol, quinidine, and verapamil between human ex vivo trabeculae and in silico ventricular models incorporating inter-individual action potential variability. *Front Physiol.*, 8, 597. doi: 10.3389/fphys.2017.00597. eCollection 2017.
37. Vicente, J., Johannesen, L., Mason, J.W., Crumb, W.J., Pueyo, E., Stockbridge, N. and Strauss, D.G. (2015) Comprehensive T wave morphology assessment in a randomized clinical study of dofetilide,

- quinidine, ranolazine, and verapamil. *J Am Heart Assoc.*, 4(4). pii: e001615. doi: 10.1161/JAHA.114.001615.
38. Van der Linde, H.J., Van Deuren, B., Teisman, A., Towart, R. and Gallacher, D.J. (2008): The effect of changes in core body temperature on the QT interval in beagle dogs: a previously ignored phenomenon, with a method for correction. *Br J Pharmacol.*, 154, 1474-1481.
 39. El Amrani, A.I., El Amrani-Callens, F., Lorient, S., Singh, P. and Forster, R. (2016): QT interval correction for drug-induced changes in body temperature during integrated cardiovascular safety assessment in regulatory toxicology studies in dogs: A case study. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 81, 136-143.
 40. Lions, S., Dragu, R., Carsenty, Y., Zukermann, R. and Aronson, D. (2018) Determinants of cardiac repolarization and risk for ventricular arrhythmias during mild therapeutic hypothermia. *J Crit Care.*, 46, 151-156.
 41. Hegarty, J., Walsh, E., Burton, A., Murphy, S., O'gorman, F. and McPolin, G. (2009) Nurses' knowledge of inadvertent hypothermia. *AORN J.*, 89, 701-704.
 42. Fosgerau, K., Weber, U.J., Gotfredsen, J.W., Jayatissa, M., Buus, C., Kristensen, N.B., Vestergaard, M., Teschendorf, P., Schneider, A., Hansen, P., Raunsø, J., Køber, L., Torp-Pedersen, C. and Videbaek, C. (2010) Drug-induced mild therapeutic hypothermia obtained by administration of a transient receptor potential vanilloid type 1 agonist. *BMC Cardiovasc Disord.*, 10, 51.